

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**



**DIPARTIMENTO di MEDICINA VETERINARIA E PRODUZIONI  
ANIMALI**

**TESI di DOTTORATO DI RICERCA**

in

**BIOLOGIA PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA  
VETERINARIA**

Triennio 2010-2013

XXV ciclo

***PRESENZA E DISTRIBUZIONE DELLE ACQUAPORINE  
NELL'APPARATO INTESTINALE DEL VITELLO BUFALINO***

***Coordinatore  
Prof. G. Cringoli***

***Tutor  
Prof. L. Avallone***

***Candidato  
Dr. Giuseppe Vassalotti***

Sei un uomo fortunato.

Che ancora scorgi la meraviglia, ancora ti dimeni quando l'indignazione ti tende subdoli agguati.

Neanche ti sfiora la vanità del tuo agire così come di ognuno nell'incessante frastuono del divenire.

Sei fortunato perché stai imparando a piegarti al vento senza perdere il riferimento del tuo orizzonte, ed è così che scoprirai, un giorno, che l'Arte è il gioco tra il vivere e il sopravvivere.

A Mamma, Marco, Pietro e Roberta, persone che, con l'esempio della propria moderazione, si sono rivelate guida nei momenti difficili e sostegno nel conservare sempre ben salde le mie gambe.

Agli studenti, stimolo quotidiano nella crescita professionale.

Al mio profondo AMORE per la MEDICINA VETERINARIA.

## Sommario

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>LE ACQUAPORINE .....</b>	<b>5</b>
Struttura.....	7
Permeabilità e selettività delle acquaporine .....	9
Trasporto del glicerolo nelle acquaporine .....	11
Acquaporine nei mammiferi .....	12
<b>MORTALITA' NEONATALE NEL VITELLO BUFALINO .....</b>	<b>16</b>
<b>IL COLOSTRO.....</b>	<b>19</b>
<b>IL LATTE DI BUFALA .....</b>	<b>23</b>
<b>APPARATO DIGERENTE DEL VITELLO BUFALINO: ANATOMIA E</b>	
<b>FISIOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
Intestino Tenue .....	30
Intestino crasso.....	31
<b>MECCANISMI DI ASSORBIMENTO DELLE PRINCIPALI COMPONENTI</b>	
<b>NUTRITIVE NEL VITELLO.....</b>	<b>32</b>
Digestione delle proteine .....	32
Digestione dei glucidi .....	34
Digestione dei lipidi .....	35
<b>ACQUAPORINE NELL'APPARATO DIGERENTE .....</b>	<b>37</b>
<b>PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>51</b>
Scopo della ricerca.....	51
Materiali e metodi .....	53
Scelta dei soggetti e raccolta dei campioni .....	53
Immunistoichimica .....	54
Western blot.....	56

Estrazione dell' RNA, sintesi del cDNA, RT-PCR e sequenziamento.....	59
Risultati .....	61
AQP1 .....	61
Immunoistochimica .....	61
Western blotting.....	64
Analisi densitometrica.....	66
RT-PCR.....	67
AQP4.....	68
Immunoistochimica .....	68
Western blot .....	71
Analisi densitometrica.....	73
RT-PCR.....	74
AQP5.....	75
Immunoistochimica .....	75
Western blot .....	78
Analisi densitometrica.....	80
RT-PCR.....	81
<b>DISCUSSIONI E CONCLUSIONI .....</b>	<b>82</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>88</b>
<b>Indice delle figure .....</b>	<b>108</b>
<b>Indice delle tabelle.....</b>	<b>109</b>

## INTRODUZIONE

L'allevamento del bufalo in Italia rappresenta, oggi, una realtà economica dalle potenzialità sempre più crescenti; la riduzione della redditività dell'allevamento bovino, che si sta sempre più manifestando in Italia, ha spinto molti allevatori a passare all'allevamento bufalino per produrre latte (idoneo alla preparazione della Mozzarella), e carne (settore, quest'ultimo, in forte espansione).

Dal 1961 al 2008, nei paesi in cui è allevato il bufalo, la popolazione bovina è incrementata del 43%, mentre quella bufalina ha avuto un aumento del 105% (Faostat.fao.org/faostat).

Dal 1995 al 2007, le popolazioni mondiali di bovini e bufalini hanno avuto un incremento rispettivamente del 2% e del 13%. In India, in particolare, la popolazione bovina ha subito una riduzione del 12% mentre quella bufalina un aumento del 11.7% [1]

Analizzando la situazione mondiale, si può notare una certa variazione dell'indirizzo produttivo e dei sistemi di allevamento, anche in funzione del livello tecnologico raggiunto dai vari paesi.

In buona parte dell'Asia, infatti, i bufali sono usati principalmente come animali da lavoro e marginalmente per la carne. Se si esclude l'isola di Taiwan, dove l'interesse per la carne di bufalo è in netto aumento, sono usualmente macellati solo i soggetti a fine a carriera.

In altri stati (Tailandia, India, Pakistan, Sri Lanka, Nepal, Sud della Cina, Indonesia, Filippine), invece, sia il River che lo Swamp bufalo sono allevati anche per la produzione di latte, che ha fatto registrare negli ultimi anni un incremento del 247% [2] [3].

In Africa il bufalo è allevato solo in Egitto come animale da lavoro e per la produzione di latte [4], mentre in America meridionale è un ottimo animale da carne, anche se aumentano sempre più le aziende che producono latte per la caseificazione [5].

Attualmente i bufali sul territorio nazionale sono circa 361.411, il 73 % dei quali si trova in Campania (Dati forniti dalla BDN dell'anagrafe zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'IZS Abruzzo e Molise).

Il notevole incremento del patrimonio bufalino ha interessato contemporaneamente sia aree tradizionalmente vocate sia zone nuove a tale tipo di allevamento.

I motivi di tale espansione vanno cercati nella crescente domanda di latte da parte del settore della trasformazione, principalmente a causa dell'aumento dei consumi della mozzarella di bufala Campana.

Nelle aziende zootecniche, pianificare e gestire correttamente l'allevamento del vitello bufalino rappresenta una fase molto delicata dell'intero ciclo produttivo, sia esso destinato alla rimonta o al macello: qualsiasi errore commesso in questa fase si ripercuote inesorabilmente sulle prestazioni produttive future.

Un corretto e graduale passaggio dalla fase neonatale a quella successiva dello sviluppo garantisce di superare con successo la fase di svezzamento assicurando all'azienda, oltre all'indispensabile quota di rimonta, la possibilità di scegliere i soggetti più interessanti da mantenere in azienda ai fini del miglioramento genetico e una fonte di reddito costituita dagli animali da immettere sul mercato.

In questo scenario, non bisogna trascurare il vantaggio che un'ottimizzazione delle tecniche di allevamento - per quanto concerne lo

svezzamento e l'accrescimento - comporterebbe sull'efficienza della produzione del vitello bufalino da carne.

Oggi sono ancora troppe le aziende italiane che lamentano indici di mortalità superiori alle medie fisiologiche o che non riescono ad anticipare sufficientemente lo svezzamento delle vitelle per avviarle, in buono stato di salute e con un rumine ormai pronto a digerire foraggi e concentrati, alla successiva fase di accrescimento. Ciò ha comportato, nella maggior parte delle aziende, un netto rallentamento del miglioramento genetico.

Nei primi giorni di vita il vitello neonato subisce una serie di modificazioni morfologiche e funzionali a carico dell'epitelio gastrointestinale, necessarie per il suo adattamento alla vita. Sebbene la ricerca di base abbia individuato e studiato numerosi "stressor" in grado di condizionare le capacità di adattamento, la morbidità e la mortalità neonatale rimangono un problema di rilevante importanza per l'allevamento bufalino.

Come riportato in numerosi studi, per un corretto sviluppo del sistema immunitario del vitello bufalino si deve considerare in alto grado l'assunzione colostrale precoce, cui consegue il fisiologico sviluppo dell'apparato gastrointestinale.

È stato, infatti, ampiamente dimostrato che un'insufficiente immunizzazione passiva, conseguente a un' inadeguata o ritardata assunzione di colostro o all'assunzione di colostro di scarsa qualità, ovvero a basso tenore anticorpale, favorisce le insorgenze delle più comuni infezioni neonatali.

Pertanto, un'immunizzazione acquisita passivamente attraverso l'assunzione precoce di colostro materno fornisce una quota di proteine di altissimo valore biologico difficilmente sostituibili da alcun surrogato prodotto artificialmente.

La capacità di adattamento nei primi giorni di vita è affidata soprattutto

all'intestino, che svolge un ruolo determinante nei processi di assorbimento di nutrienti, elettroliti e fluidi [6].

A oggi, i processi biologici coinvolti nell'assorbimento intestinale delle diverse componenti colostrali non sono del tutto noti. Approfondire le conoscenze di tali meccanismi consentirebbe senza dubbio un miglioramento dei fattori che favoriscono questo delicato processo.

In riferimento a ciò, in questi ultimi anni sono state proposte numerose ipotesi a riguardo dei meccanismi biochimici coinvolti nella realizzazione di tali meccanismi di assorbimento.

Tra questi merita un certo rilievo la scoperta, alla fine degli anni ottanta, di alcune proteine canale note come acquaporine (AQPs), direttamente coinvolte nei meccanismi di trasporto rapido e selettivo di acqua e di soluti attraverso la membrana cellulare [7].

Tali proteine, in funzione del ruolo svolto quali trasportatrici di acqua e altre molecole, potrebbero svolgere un ruolo importante anche nel complesso meccanismo di regolazione di processi di assorbimento nel vitello bufalino, in particolar modo durante l'assunzione di alimento.



## LE ACQUAPORINE

Le Aquaporine rappresentano una Famiglia di proteine canale, diffusamente distribuite nel regno animale e vegetale, che partecipano all'equilibrio delle molecole d'acqua all'interno o all'esterno delle cellule di specifici tessuti.

La loro scoperta, avvenuta nel 1987, si deve all'ematologo Peter Agre, Nobel per la chimica nel 2003, il quale, compiendo studi sui globuli rossi, scoprì per caso un polipeptide da 28 kDa, che risultò essere molto abbondante sia nei globuli rossi sia nei tubuli renali prossimali [8].

La proteina, denominata all'epoca "Chip28" (Channel forming Integral protein of 28 kDa), si presentava come un tetramero con funzione di porocanale.

In un esperimento di Peter Agre e collaboratori, pubblicato nel '93, la proteina in questione venne overespressa in oociti di *Xenopus*, che normalmente si presentavano scarsamente permeabili all'acqua.

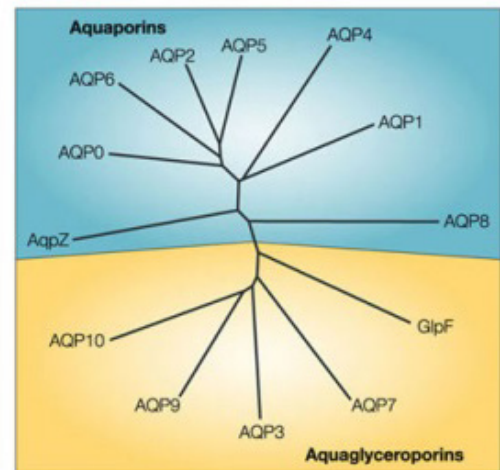
I due ricercatori notarono che gli oociti di controllo rimanevano tali, mentre quelli con la proteina overespressa aumentavano la loro permeabilità all'acqua. Fu dunque dimostrato che Chip28 doveva essere specifica per il trasporto dell'acqua [9]. Da questo momento in poi la proteina prenderà il suo nome definitivo: "Acquaporina 1".

Le Acquaporine possono essere classificate in funzione della loro permeabilità (Tab.1) e in funzione delle sostanze che possono attraversarle.

Esse possono essere divise in due grandi famiglie: le acquaporine specifiche per l'acqua e le acquagliceroporine, in grado di trasportare sia acqua che glicerolo.

Identificazione Acquaporina	Permeabilità
Acquaporine 1 Acquaporine 2 Acquaporine 5 Acquaporine 8	Media
Acquaporina 0 Acquaporina 3	Bassa
Acquagliceroporine 7 Acquagliceroporine 9	Intermedia
Acquaporina 6	Anomala

**Tabella 1: Classificazione delle Acquaporine.**  
Tratta da wikipedia  
<http://it.wikipedia.org/wiki/Aquaporine>



**Figura 1: Famiglie di acquaporine tratto da: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 687-698 (September 2004)**

Le acquaporine di *E. Coli* sono state denominate Aqp Z e GlpF (Fig 1).

La maggior parte delle acquaporine del primo gruppo sono permeabili unicamente all'acqua. Esse sono AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, AQP8.

La AQP6 e la AQP8 vengono incluse in questo gruppo sulla base della loro sequenza amminoacidica nonostante la 6 sia permeabile agli anioni e la 8 all'urea.

Le acquagliceroporine AQP3, AQP7, AQP9 e AQP10 sono permeabili all'acqua ma anche ad altri soluti in particolare al glicerolo.

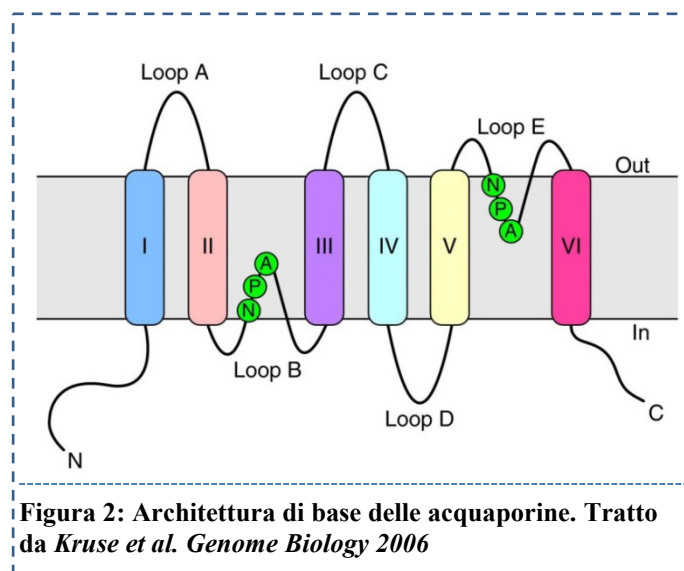
Il batterio *Escherichia coli* rappresenta un modello per questa classificazione in quanto contiene due acquaporine omologhe, AQPz un canale per l'acqua e GlpF trasportatore per il glicerolo [10].

## Struttura

L'acquaporina si presenta come una proteina di membrana costituita da quattro subunità (tetramero), ognuna di 28 kDa. La struttura molecolare delle acquaporine è rappresentata dal classico “modello a clessidra” pensato da Jung e coll. nel 1994 [11].

Ogni monomero è formato da sei domini (eliche) transmembrana (I II III IV V VI) (Preston e coll., 1991) e da cinque anse di collegamento, con le terminazioni NH<sub>2</sub>- e COOH-terminali citoplasmatiche (loop) (A B C D E).

L'architettura di base di queste unità funzionali è quindi costituita da due segmenti ripetuti (tandem repeats) (I III e IV VI), ciascuno formato da tre eliche transmembrana unite ed un lungo “loop” idrofobico ; le anse B ed E mostrano un sequenza NPA (asparagina, prolina alanina) [12], estremamente conservata fra le acquaporine.



La struttura, ottenuta per cristallografia a raggi X, ha dimostrato che i due “loop s” contenenti i motivi conservati NPA presentano una struttura a elica e

che le dimensioni delle eliche, chiamate “eliche -poro”, non attraversano il doppio strato ma ne raggiungono solo la parte centrale. Gli N-terminali delle due mezze eliche puntano uno contro l'altro al centro del doppio strato senza attraversarlo [13].

La formazione del porocanale per il passaggio dell'acqua è dovuto proprio al ripiegamento delle anse B ed E (Fig. 2).

Dall'elica II parte un “loop” di connessione che entra nella membrana. Arrivato circa a metà, si compone in una mezza elica il cui N-terminale punta al centro del doppio strato mentre il C-terminale si trova al bordo di quest'ultimo.

Lo stesso accade al “loop” che congiunge le eliche V e VI. Le due mezze eliche, che sono parte dei due lunghi “loops”, iniziano entrambe dal centro del doppio strato per arrivare fino a uno solo dei due estremi di quest'ultimo.

Nel modello, tre eliche da una parte e le altre tre dall'altra formano le pareti del canale, mentre il motivo conservato NPA, all'interno del canale stesso, rappresenta il filtro di selettività [14].

All'interno del secondo “loop” contenente la sequenza NPA è presente un residuo di cisteina che spiega l'inattivazione mercurio-dipendente.

La struttura tridimensionale ha dimostrato che il canale nella parte iniziale ha una larghezza di circa a 14-15 Å. Nella zona centrale, per una lunghezza di circa 20 Å il canale mantiene una larghezza piuttosto stretta (intorno ai 4 Å) con un punto di restringimento minimo di circa 2.8 Å dopodiché ritorna ad allargarsi (forma a “V”) assumendo così la caratteristica forma a clessidra.

L'acquaporina è un tetramero ma l'unità funzionale è il monomero; ovvero il trasporto viene effettuato da ogni singola subunità, per cui ogni tetramero porta in realtà 4 canali, uno per ogni monomero [15]

Il numero di molecole d'acqua trasportate è estremamente alto:  $3 \times 10^9$  molecole di acqua per subunità per secondo [16].

### ***Permeabilità e selettività delle acquaporine***

L'acqua si diffonde attraverso le acquaporine anche in condizioni di equilibrio. Diversi studi hanno mostrato che le molecole d'acqua traslocano attraverso le acquaporine in un modo altamente correlato: il canale è quasi sempre occupato da circa sei molecole d'acqua che si muovono simultaneamente [17].

Il coefficiente di diffusione risulta infinitamente più alto rispetto a quello del passaggio dell'acqua attraverso il bilayer fosfolipidico [18].

In ogni caso, in condizioni di equilibrio, non c'è un flusso netto di acqua attraverso le acquaporine, per cui potrebbero sorgere dubbi sulle modalità di trasporto attraverso le membrane cellulari.

La risposta è che le condizioni fisiologiche sono generalmente molto lontane dall'equilibrio. Ad esempio, concentrazioni differenti di soluti impermeabili dai due lati di una membrana inducono una differenza di pressione osmotica verso quest'ultima. Il risultato è che l'acqua passa dal lato con pressione osmotica maggiore a quello con pressione oncotica minore.

Se da un lato le acquaporine permettono un rapido passaggio di acqua, dall'altro impediscono il passaggio di ioni protoni e di altri soluti carichi elettricamente. Il gradiente di concentrazione dei protoni attraverso la membrana gioca un ruolo chiave nel metabolismo.

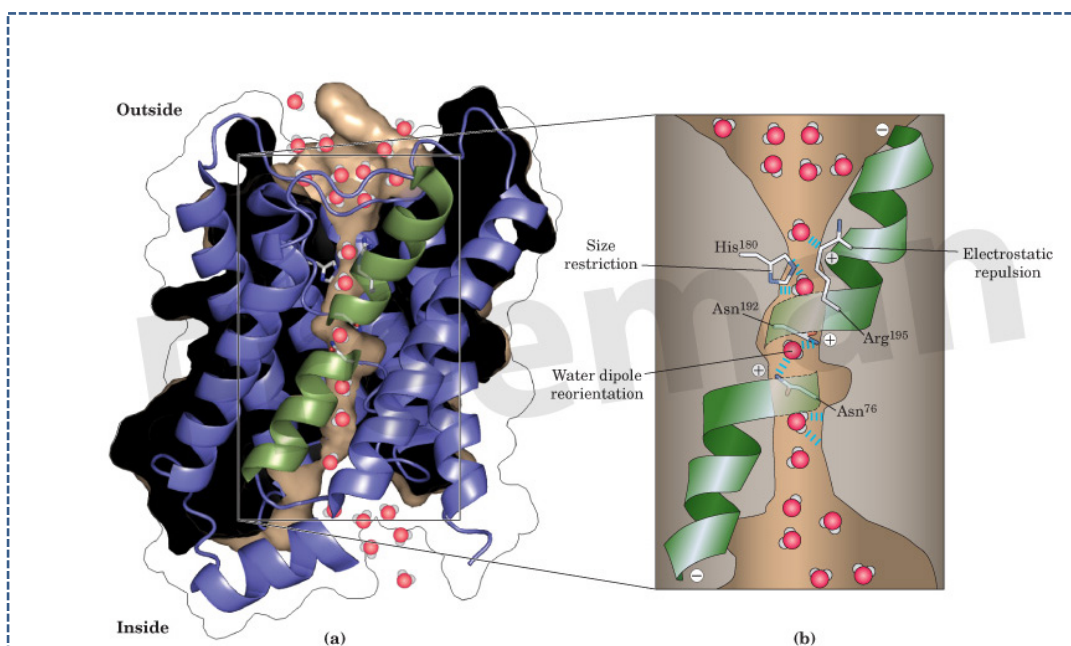
Escludendo i protoni, le acquaporine aiutano la cellula a mantenere il bilancio elettrochimico attraverso le membrane cellulari.

Un meccanismo che viene a essere utilizzato è la dimensione del canale. La figura 3 mostra che il maggior restringimento del canale si ha a circa 8 Å dal centro del canale, dove l'entrata delle molecole è controllata sia dalla dimensione che dalla repulsione elettrostatica. A questa altezza il diametro del canale è 2.8 Å [14], valore paragonabile al diametro di una singola molecola di acqua.

In questo punto sono presenti una fenilalanina (F56) che appartiene alla seconda elica transmembrana e un arginina (R195) che segue il secondo motivo NPA [17]. Questa arginina, che ha una carica positiva permanente, è fortemente conservata nelle acquaporine.

Opposta all'arginina si trova un'istidina (H180), anch'essa conservata in tutte le acquaporine che trasportano solamente acqua. A pH neutro questa istidina è carica positivamente e insieme all'arginina forma sia un filtro dimensionale, per molecole più grandi dell'acqua, sia un filtro elettrostatico che può repellere protoni e altri cationi.

Il poro è poi formato dai carbonili della catena principale di quattro residui sequenziali G188, C189, G191 e I191 che possono permettere la formazione di possibili legami idrogeno con molecole di acqua. La presenza della cisteina 189 nella regione più stretta spiega l'inibizione del canale da parte di ioni  $\text{Hg}^{2+}$ .



**Figura 3: Rappresentazione schematica del canale che evidenzia i meccanismi principali su cui si basa la selettività di trasporto tratto da: Lehninger Principles of Biochemistry 2008 W. H. Freeman Dave Nelson and Mike Cox.**

La più singolare caratteristica delle acquaporine risiede nella loro capacità di essere in grado di prevenire completamente il trasporto di protoni, nonostante il flusso di molecole di acqua sia estremamente efficiente, nell'ordine di  $3 \times 10^9$  molecole al secondo [16].

La straordinarietà è dovuta al fatto che una linea continua di molecole di acqua costituisce notoriamente un sistema efficiente per il trasporto di protoni. Questo sistema infatti forma un cosiddetto “filo di protoni” dove un protone può muoversi da un'estremità ad un'altra attraverso l'effetto Grotthuss [19], basato sulla capacità di un protone di passare da una molecola di acqua ad un'altra quando queste sono collegate con legami idrogeno aventi la stessa polarità.

### ***Trasporto del glicerolo nelle acquaporine***

Le acquaporine sono in grado di trasportare acqua escludendo i soluti con carica elettrica. Ciò nonostante, esiste una sottofamiglia, denominata acquagliceroporina, in grado di trasportare molecole di carboidrati lineari, sostanzialmente attraverso un aumento del diametro dei pori.

L'acquagliceroporina GlpF trasporta il glicerolo insieme all'acqua ed è stato notato che, in particolari orientamenti molecolari, le molecole di glicerolo passano preferibilmente attraverso il canale mostrando stereoselettività per questa molecola. [20].

Quando il glicerolo entra nel canale con orientamento favorevole, si formano una serie di ponti idrogeno tra i gruppi idrossilici del glicerolo e la proteina. Inoltre la porzione alifatica del glicerolo è perfettamente diretta verso il lato idrofobico del GLPF.

Valutando nel complesso la dinamica del passaggio dell'acqua e di altre molecole attraverso le acquaporine, si può sicuramente affermare che - anche se le AQP<sub>s</sub> generalmente appaiono come canali d'acqua passivi - la regolazione dell'attivazione dei canali potrebbe giocare un ruolo importante nella permeabilità di molti substrati.

Ad esempio, la fosforilazione dell' AQP<sub>4</sub>, attraverso una protein-chinasi, può portare ad una riduzione della permeabilità dell'acqua [21]. La fosforilazione mediante apertura dei canali dell'acqua è stata mostrata anche in un acquaporina vegetale [22].

Altri esperimenti suggeriscono che il poro centrale (il quinto tetramero dell'acquaporina) può condurre ioni dopo essere stato aperto. E' noto che i canali ionici usano il poro centrale di un tetramero per ottenere un flusso di ioni. E' interessante quindi notare che l'organizzazione tetramerica delle acquaporine ricorda quella dei canali ionici.

### *Acquaporine nei mammiferi*

Le acquaporine sino ad ora identificate nei mammiferi sono dodici, numerate da 0 a 11 in ordine di scoperta. Esse risultano essere estremamente conservate a diversi livelli evolutivi, partendo dai procarioti sino agli eucarioti superiori.

Questo dato è indice di una rilevante importanza funzionale del canale.

L'AQP<sub>0</sub> (MIP 26) è stata scoperta grazie all'elevata omologia con la CHIP28; si localizza a livello del cristallino ed ha una minima permeabilità all'acqua. La sua funzione è attualmente ignota.



**L'AQP<sub>1</sub>** (Channel Forming Integral Protein) [9]; è stata la prima acquaporina a essere scoperta. Essa ha un peso molecolare di 28 kDa e risulta essere espressa in diversi tipi cellulari tra cui eritrociti, nel tubulo prossimale, nel tratto discendente dell'ansa di Henle, negli alveoli polmonari, nel colon, nella cornea e in altri tessuti. Essa è presente in membrana sottoforma di omotetramero, in cui ogni unità monometrica è un canale funzionalmente indipendente e due delle quattro subunità presentano residui glicosidici.

**L'AQP<sub>2</sub>** (WCH-CD, Water Channel Collecting Duct) è espressa selettivamente nella membrana apicale delle cellule principali del dotto collettore [23] ed è implicata nel riassorbimento di acqua indotto dall'ormone antidiuretico (ADH).

**L'AQP<sub>3</sub>** presenta siti di localizzazione molto variegati. Come dimostrato da esperimenti di immunolocalizzazione, essa è presente nelle cellule principali del dotto collettore, nella porzione basolaterale delle cellule della trachea, nell'epitelio congiuntivale dell'occhio (dove pare essere responsabile della secrezione della componente acquosa delle lacrime) e nella membrana basolaterale delle cellule epiteliali dei villi del colon distale della pelle e della vescica urinaria [24]. Essa, inoltre, è abilitata al trasporto di altre piccole molecole come glicerolo e urea [25].

**L'AQP<sub>4</sub>** è stata inizialmente clonata da una genoteca di cDNA di polmone [26] e successivamente da una di cervello [11].

Ha un peso molecolare di 30 kDa e si presenta sotto due isoforme denominate: M<sub>1</sub> ed M<sub>23</sub>. Esse non mostrano differenze strutturali, nonostante la coda aggiuntiva di ventitré amminoacidi che reca la seconda isoforma. Presenta inoltre un'elevata omologia con la CHIP28 nonostante differisca da questa per la

sua spiccata caratteristica di rimanere insensibile agli agenti mercuriali, motivo per il quale è anche conosciuta come MIWC (Mercurial Insensitive Water Channel) [26] [11].

L'AQP<sub>4</sub> si localizza in diversi distretti tissutali ma la sua espressione è predominante nel sistema nervoso centrale (dove si può riscontrare a livello delle cellule endoteliali dei ventricoli cerebrali), nel rivestimento del sistema acquiduttale del cervello, nello strato del Purkinje del cervelletto e nei nuclei sovraottico e paraventricolare dell'ipotalamo [11]. E' probabilmente coinvolta nell'osmoregolazione di quest'ultimo distretto.

Per quanto riguarda il rene, l'AQP<sub>4</sub> è stata individuata nella porzione basolaterale delle cellule principali del dotto collettore [27] laddove esiste una spiccata permeabilità all'acqua.

Verosimilmente l'AQP<sub>4</sub> determina la fuoriuscita dalle cellule dell'acqua entrata attraverso l'AQP<sub>2</sub>, localizzata nella porzione apicale. A dimostrazione della veridicità di questo processo esistono esperimenti condotti su topi knock-out per l'AQP<sub>4</sub> le cui urine risultano meno concentrate se paragonate a quelle dei relativi topi controllo [28].

Inoltre l'AQP<sub>4</sub>, insieme all'AQP<sub>2</sub> e all'AQP<sub>3</sub>, è localizzata a livello delle cellule del dotto collettore [29] [27]. Altri siti in cui è presente l'AQP<sub>4</sub> sono le cellule epiteliali delle vie aeree [27], il colon, gli occhi, le ghiandole salivari e lacrimali e la membrana basolaterale delle cellule parietali della mucosa gastrica.

L'AQP<sub>5</sub>, identificata mediante clonaggio per omologia, è espressa nelle ghiandole salivari e lacrimali, nella trachea e nel polmone. Risulta essere inibita da agenti mercuriali.

L'AQP6 è espressa selettivamente nel rene, mentre l'AQP7 e l'AQP8 sono state isolate e clonate dal testicolo di ratto e sono espresse maggiormente nell'apparato genitale maschile. L'AQP8 è in aggiunta presente nel pancreas nel fegato di ratto [30].

L'AQP9, invece, è stata clonata dal tessuto adiposo umano [31], dal fegato di ratto e dai leucociti umani; studi funzionali hanno messo in evidenza che tale acquaporina possa trasportare anche altri soluti come purine, pirimidine e pioli oltre a glicerolo ed urea come l'AQP3 e l'AQP7.

L'AQP10, sebbene isolata da testicolo, è risultata essere uno pseudogene.

L'AQP11, infine, è stata riscontrata in numerosi tessuti di ratto tra cui rene, fegato, cervello e testicolo. Presenta una distribuzione unica nel cervello, essendo espressa a livello dei dendriti delle cellule del Purkinje, nei neuroni dell'ippocampo del CA1 e CA2, e nei neuroni cerebrali corticali.

Gli oociti di *Xenopus* che esprimono l'AQP11 in membrana non sono capaci di veicolare acqua, glicerolo, urea o ioni [32]. La funzione di tale acquaporina è anomala rispetto a tutte le altre e rimane pertanto non ben definita.

## MORTALITA' NEONATALE NEL VITELLO BUFALINO

La mortalità neonatale e perinatale rappresenta tuttora una delle maggiori cause di perdita economica per gli allevatori di vitelli, sia bovini che bufalini; la percentuale dei morti varia dall' 8.7 al 64% circa ed è correlata positivamente alle condizioni igienico-sanitarie dell'allevamento ma soprattutto al grado di immunizzazione passiva.

Per avere una stima dell'importanza economica di questo aspetto basta considerare che una mortalità del 20% provoca una perdita netta del 38% circa del profitto di un' azienda [33].

L'84% delle perdite di vitelli per decessi si verifica durante il primo mese di vita; di questi, ben il 75% nei primi sette giorni[34], mentre la restante parte entro la terza settimana [35]. Sulla base del periodo di insorgenza, le malattie più comuni nei vitelli si possono distinguere in:

- Malattie fetali: patologie che colpiscono il feto nella vita intrauterina; ad esempio difetti congeniti, gestazione prolungata, etc.; tali patologie spesso esitano in aborto o mortalità neonatale elevatissima.

- Malattie della gestante: patologie associate a distocia che provocano anossia cerebrale e alterazioni gravi dello scheletro.

- Malattie perinatali: patologie a insorgenza precoce (entro le 48 ore di vita); sono secondarie a fattori materni (inadeguate cure parentali e malnutrizione), fattori ambientali (ipo e ipertermia da freddo o caldo eccessivi), fattori infettivi (colibacillosi o infezioni ombelicali).

- Malattie neonatali: patologie che insorgono tra il secondo e il settimo giorno di vita, per lo più conseguenti ad assenza di cure materne cui consegue ridotta assunzione di anticorpi colostrali; il ridotto o mancato trasferimento dell'immunità passiva è responsabile di un aumento esponenziale della suscettibilità alle infezioni.

– Malattie postnatali: patologie che insorgono tra la prima e la quarta settimana di vita; sostenute da agenti infettivi e correlate a un cattivo management aziendale (es. enterotossiemie).

I fattori predisponenti le patologie del vitello lattante sono legati all'ambiente (sistema di allevamento, clima, affollamento), all'alimentazione (cambiamenti bruschi della dieta o sanità dei prodotti), alle cure dell'allevatore.

Le patologie più comunemente rilevate nell'allevamento del vitello fanno riferimento primariamente alle turbe digestive [36], all'immunodeficienza, alle patologie respiratorie [37], alle affezioni cutanee [38] conseguenti all'errato management aziendale.

Studi sull'incidenza delle patologie neonatali dimostrano che le turbe gastroenteriche hanno incidenza maggiore nei primi dieci giorni di vita e si rendono responsabili dell'80% della mortalità dei vitelli; dal 10° al 30° giorno, invece, prendono il sopravvento le patologie a carico dell'apparato respiratorio; successivamente i due tipi di patologie incidono nella stessa misura [39].

Le forme diarroiche costituiscono, dunque, una sindrome a eziologia molto complessa, che coinvolge fattori di tipo infettivo e fattori predisponenti di tipo ambientale, nutrizionale, fisiologico e gestionale [40].

Esse derivano, dunque, dalla combinazione di fattori di rischio [41] [42] (difese inadeguate, sovraffollamento, presenza di portatori sani) e fattori determinanti la patologia (di origine batterica o virale).

Le diarree possono essere attribuite a due forme principali:

- Forme a eziologia infettiva: le turbe digestive responsabili di diarrea neonatale sono sostenute da cause infettive di origine batterica, virale e parassitaria.

Gli agenti infettivi maggiormente isolati sono il Rotavirus [43], il Coronavirus [40] [43], l'E. Coli [44] [45], la Salmonella [46], il Cryptosporidium [47] ed il Campylobacter [48].

- Forme a eziologia non infettiva: le turbe digestive responsabili di diarrea neonatale sono favorite da cause che predispongono l'insorgenza della malattia e che risultano di natura non infettiva.

Tra queste, senz'altro le più rilevanti sono da ricondurre a mancata o scarsa somministrazione colostrale, oppure a somministrazione di colostro di qualità scadente, a errata modalità di preparazione del latte ricostituito, a scarsa igiene dell'allevamento, a somministrazione eccessiva di alimenti o a cattiva qualità di questi [38].

## IL COLOSTRO

Il colostro rappresenta la secrezione della ghiandola mammaria prodotta nei primi giorni dopo il parto. Conserva caratteristiche fondamentali, quali la presenza di anticorpi e sali minerali, l'ottima digeribilità e la disponibilità immediata in seguito al parto [49]. Le sue caratteristiche fisiche peculiari vedono un colore bianco-giallastro, densità maggiore rispetto al latte, sapore e odore peculiari.

Il colostro costituisce un alimento dall'altissimo valore nutritivo: rispetto al latte è più digeribile, più energetico, con elevate quantità di vitamine e oligominerali, ricco di enzimi, ormoni, fattori di crescita e soprattutto immunoglobuline [50].

Il vitello bufalino, alla nascita, si presenta ipogammaglobulinico. La scarsissima presenza anticorpale è secondaria al tipo di placentazione dei ruminanti (epitelio-coriale, classificazione secondo Grasser [51]), impermeabile quasi totalmente agli anticorpi materni [52]. L'immunità parentale è, dunque, trasmessa solo dopo la nascita con l'assunzione di colostro.

Le Immunoglobuline G (IgG) provenienti dal colostro originano dalla componente ematica della ghiandola mammaria.

Le Immunoglobuline A (IgA) e le Immunoglobuline M (IgM) originano dalle plasmacellule; le IgA, in questa sede, si legano a un recettore proteico che le proteggerà poi dall'attività proteolitica a livello intestinale [51].

Il colostro, quindi, grazie ai suoi importantissimi componenti, assume funzioni fondamentali quali:

- Funzione energetica e nutritiva
- Funzione immunitaria
- Funzione lassativa [53]
- Funzione antianemica
- Funzione vitaminica

L'apporto di vitamine colostrali è nettamente superiore a quella del latte; in particolare della vitamina A, la cui carenza è alla base di una maggiore recettività alle infezioni [54].

L'incremento ponderale dell'8-10% verificato nei primissimi giorni di vita del vitello è da attribuirsi proprio all'assunzione corretta del colostro che favorisce il superamento del periodo di stress postnatale [55].

La quantità totale di immunoglobuline riscontrate nel colostro arriva a valori compresi tra 50 e 150 mg/ml, di cui l'85-90% di IgG, il 7% circa di IgM ed il 5% di IgA.

Le immunoglobuline maggiormente assimilate a livello intestinale sono le IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e le IgM, [55]. Le IgA, invece, restando escluse dai processi assorbitivi, offrono una rilevante protezione all'epitelio intestinale da batteri e virus.

L'immunoprotezione conferita dalle immunoglobuline è essenziale per la sopravvivenza del vitello; studi recenti sostengono che la ritardata o mancata assunzione del colostro predispone i vitelli a infezioni talvolta mortali [56].



È stato infatti ampiamente dimostrato che i neonati, privati del colostro, crescono stentatamente e presentano un indice di mortalità notevolmente elevato [57].

Le immunoglobuline, mediante un processo di micropinocitosi, entrano in circolo a partire dal piccolo intestino del vitello neonato [33]; le cellule epiteliali della mucosa intestinale assimilano le immunoglobuline attraverso la via linfatica con intensità maggiore nel digiuno [51] [58].

La capacità di assorbimento è massima nelle prime ore di vita e tende a diminuire intorno alle 24-48 ore. Inoltre, le macromolecole proteiche, grazie all'elevata permeabilità dell'epitelio intestinale nelle prime ore di vita, non sono assorbite selettivamente.

Il picco massimo di assorbimento avviene nelle prime 6-8 ore dopo la nascita [59] nonostante sia dimostrata un'elevata variabilità individuale [60].

Le immunoglobuline colostrali, al primo giorno dopo il parto, risultano pari a 55 - 68 grammi/litro di colostro. Un picco pari a 80 grammi/litro si verifica nella prima ora.

A 48 ore dal parto, invece, la concentrazione di Ig subisce un significativo decremento del 10% circa rispetto al valore iniziale [61].

L'assunzione ottimale del colostro avviene solo per un breve periodo dopo la nascita (12 ore dal parto) [57] e finisce prima del secondo giorno di vita del soggetto [52].

L'ingestione precoce di colostro viene ad assumere un ruolo cruciale per la salute del vitello sia perché l'epitelio intestinale diventa refrattario all'assorbimento delle immunoglobuline sia perché il colostro stesso, trasformandosi in latte, non riesce più a svolgere il proprio compito [62] [63].

Il ritardo nella suzione, che spesso coinvolge fino al 40% dei soggetti, causa quindi un insufficiente trasferimento dell'immunità passiva dalla madre al redo [64].

Inoltre, i vitelli che non ingeriscono colostro precocemente vanno incontro a patologie gastrointestinali, respiratorie (20.4 vs 7.5%) e a episodi di mortalità neonatale (8.3 vs 1.6%) rispetto ai soggetti gestiti in maniera ottimale [65].

Altro dato da tenere in considerazione è la competizione per l'occupazione dei siti recettoriali deputati al trasporto in circolo, esistente tra le popolazioni di microrganismi, presenti a livello intestinale, e le immunoglobuline ingerite con il colostro durante il periodo massimo dell'assorbimento.

Quando i microrganismi riescono a prendere il sopravvento sui siti recettoriali, si verifica una sindrome da malassorbimento con successiva ipo o agammaglobulinemia [48]. Anche la modalità di somministrazione del colostro influisce notevolmente sulle quantità assunte dagli animali: l'allattamento naturale alla mammella consente una assunzione di colostro del 41% superiore rispetto a quella che si ottiene mediante somministrazione con poppatoio [66].

Probabilmente l'atteggiamento della suzione, con la testa estesa sul collo, favorisce un'adeguata apertura della doccia esofagea con conseguente maggiore quantità di alimento assunto. Il vitello nelle prime 5 - 6 ore di vita dovrebbe ingerire una quantità di colostro almeno pari ad 1.5 - 2.0 litri [50].

L'immunità attiva del vitello comincia a delinearsi già intorno alla seconda settimana di vita: il redo inizia in questo periodo la sintesi delle proprie IgG e intorno al quarto mese di vita vengono registrate concentrazioni ematiche di anticorpi sufficienti a generare una buona immunoprotezione. Nondimeno, in circostanze ottimali la sovrapposizione dell'immunità passiva e di quella attiva per 2-16 settimane assicura una protezione molto efficace in un periodo della vita molto delicato.

## IL LATTE DI BUFALA

Liquido dall'importantissimo valore biologico, il latte è costituito essenzialmente da una soluzione di carboidrati, sali, globuli lipidici in emulsione e proteine in dispersione colloidale.

La Legge italiana definisce latte il prodotto ottenuto dalla mungitura completa e regolare dell'apparato mammario di un animale in buone condizioni di salute e nutrizione [67]. Il termine latte fa riferimento a quello di bovina. Nel caso si tratti del secreto mammario di altri animali, deve essere debitamente specificato sull'etichettatura del prodotto.

La composizione chimica del latte bufalino non si discosta eccessivamente da quella del latte vaccino. In particolare, il contenuto proteico è maggiore nel latte bufalino rispetto a quello vaccino (8.3% vs 3.5%) così come il contenuto lipidico (4.7% vs 3.3%), (Tabella 2). Per quanto riguarda le caratteristiche fisiche, presenta un caratteristico colore bianco neve, inodore e dal sapore delicato.

Differentemente dal latte vaccino, quello bufalino presenta un maggior quantitativo di vitamina A, ma non del suo precursore, il  $\beta$ - carotene; l'assenza di carotenoidi invece si rende responsabile del caratteristico colore bianco [68].

La particolare composizione chimica del latte di bufala favorisce una maggiore presenza di batteri lattici che vanno ad influenzare notevolmente la sua qualità microbiologica, agendo sull'acidificazione della cagliata, sul sapore e sull'odore [69].

Il latte bufalino si distingue per un'elevata quantità di caseina rispetto al totale azotato e per un alto tenore in acidi organici a basso peso molecolare [70].

Nella tabella 2 sono illustrate le principali differenze tra il latte bovino e quello bufalino.

<b>Componenti</b>	<b>Bufala (%)</b>			<b>Vacca (%)</b>
	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>media</i>	<i>media</i>
<i>Residuo secco</i>	15.15	24.70	18.50	12.0
<i>Residuo magro</i>	9.15	11.70	10.20	8.70
<i>Lipidi</i>	6.00	13.00	8.30	3.50
<i>Protidi totali</i>	3.80	5.50	4.73	3.30
<i>Lattosio</i>	4.60	5.30	4.90	4.70
<i>Ceneri</i>	0.75	0.90	0.80	0.70
<i>Calcio</i>	0.18	0.21	0.20	0.12
<i>Fosforo</i>	0.10	0.13	1.12	0.09
<i>Magnesio</i>	0.14	0.16	0.15	1.10
<i>Contenuto calorifico</i>	<i>Kcal</i>	950	1720	1210
	<i>Mj</i>	4.00	7.20	5.10
				2.90

Tabella 2: Valori delle principali componenti del latte bufalino e bovino (Proto, 1995 – modificato 2002).

L'elevatissimo significato biologico delle proteine provenienti dal latte deriva dal loro tenore in amminoacidi essenziali; la composizione biochimica del latte dei ruminanti vede quali protagonisti, in ordine di importanza: le caseine, l' $\alpha$ -lattoalbumina, la  $\beta$ -lattoglobulina, l'albumina sierica, le immunoglobuline, la lattoferrina, la transferrina, alcuni enzimi e proteine di membrana dei globuli lipidici.

Considerata l'importanza del contenuto in proteine del latte, molti studi hanno valutato il meccanismo della biosintesi dei precursori delle proteine, ovvero gli amminoacidi, a livello di tessuto ghiandolare mammario; tali elementi chimici provengono essenzialmente dalle proteine ingerite con la dieta, progressivamente degradate e assorbite a livello intestinale e trasportate infine all'interno della cellula secretiva mammaria attraverso la parete dei capillari sanguigni con meccanismi non ancora sufficientemente chiari.

## APPARATO DIGERENTE DEL VITELLO BUFALINO: ANATOMIA E FISIOLOGIA

La porzione gastrica dell'apparato digerente del vitello bufalino è composto di quattro componenti: i tre prestomaci (rumine, reticolo, omaso) e l'abomaso, lo stomaco propriamente detto [71]

I vitelli presentano uno sviluppo dei comparti diverso rispetto agli esemplari adulti: il cosiddetto “sviluppo allometrico differenziale” comporta che il rumine e il reticolo occupino solo il 38% del complesso gastrico, mentre l'abomaso si sviluppa fino al 49% del volume.

Dopo 16 settimane dalla nascita, il rapporto risulta invertito: reticolo e rumine si espandono fino al 67% del volume totale, mentre l'abomaso passa dal 49% al 15%, una proporzione molto simile a quella dell'adulto[72].

All'atto della nascita, dunque, l'abomaso del vitello è l'unico organo funzionalmente efficiente.

Da queste osservazioni è chiaro che, per un vitello appena nato, l'unica componente funzionale della porzione gastrica dell'apparato digerente è l'abomaso.

Il periodo dello svezzamento rappresenta la fase in cui si verifica il passaggio dalla struttura anatomo-funzionale giovane a quella adulta. Durante questo processo, è gradualmente attuato il passaggio da un'alimentazione esclusivamente latte a una solida (fieno, paglia, mangime). La gradualità favorisce un adattamento progressivo delle strutture anatomiche, con notevoli cambiamenti dal punto di vista morfologico e funzionale. Alla fine dello svezzamento, il vitello sarà poligastrico a tutti gli effetti [39].

Il buono o il cattivo funzionamento dell'apparato digerente dell'adulto è correlato proprio allo sviluppo dei prestomaci, a sua volta determinato dalla

natura, dalla quantità e dalla qualità degli alimenti introdotti durante lo svezzamento. (Tabella 3).

<i>fase</i>	<i>evoluzione</i>
<i>Nascita</i>	Tratto gastroenterico sterile
<i>Poche ore dopo la nascita</i>	Microflora anaerobia facoltativa o aerotollerante in massima parte, sia di origine materna (vaginale fecale, capezzoli) che ambientale
<i>Inizio svezzamento</i>	Microflora strettamente anaerobia che raggiunge livelli di dominanza solo a livello ruminale e nel grosso intestino
<i>Animale svezzato</i>	Microflora strettamente anaerobia ampiamente dominante, di 100-1000 volte superiore a quella facoltativa. La stabilità del microbiota gastroenterico si verifica solo a svezzamento concluso.

**Tabella 3:** Schema generale della successione microbica nel tratto gastroenterico dei mammiferi (Villa e Giardini, 2007)

Per evitare un rapido accrescimento ruminale, determinata dalla somministrazione anticipata di alimento solido [71], l'alimentazione del vitello neonato deve essere esclusivamente latte. E' una sua struttura anatomica, la doccia esofagea, che consente il transito preferenziale di questo alimento liquido.

Essa si compone di una plica muscolare che, come una sorta di canale, collega direttamente l'esofago con l'ingresso dell'abomaso, estendendosi sulla superficie interna rumino-reticolare[73].

Il riflesso di chiusura della doccia esofagea , stimolato dal contatto del latte con la porzione posteriore della cavità orale, impedisce il passaggio del latte nel rumine, ancora funzionalmente inattivo, evitando fermentazioni anomale [51].

E' stato notato che l'assunzione di alimento liquido dal poppatoio, rispetto all'assunzione di latte dal secchio, favorisce e rende più efficace l'insorgere del riflesso di chiusura del canale esofageo.

La postura ideale per evitare il passaggio del latte nel comparto rumine-reticolo (testa del vitello protesa in avanti e in alto) favorisce l'imbocco della doccia esofagea e simula l'atto naturale della suzione del latte materno, con importanti vantaggi non solo funzionali ma anche comportamentali[53].

Con lo svezzamento, si assiste alla maturazione del comparto gastrico anteriore (il rumine assume il suo ruolo di fermentatore e l'omaso quello di stomaco propriamente detto), contemporaneamente alla riduzione graduale del riflesso di chiusura del canale esofageo[51] [71].

Nonostante ciò, è possibile ricreare il riflesso della doccia esofagea anche nell'adulto, al fine di introdurre medicinali liquidi direttamente in abomaso, piuttosto che disperderli a livello ruminale, dove perderebbero parte della propria funzione terapeutica[71].

Se, alla nascita, il tratto digestivo del vitello è privo di microrganismi, dopo alcune ore essi si diffondono precocemente nell'intestino.

Le modificazioni istologiche, strutturali e fisiologiche che avvengono durante lo svezzamento interessano in modo vario lo sviluppo dei prestomaci, intervenendo sia sui meccanismi d'insediamento della microflora e microfauna nel compartimento rumine-reticolo, sia sulle modalità di differenziazione delle papille della mucosa dei prestomaci, agendo dunque sul contemporaneo inizio dell'attività metabolica della mucosa stessa [39].

Per quanto riguarda l'anatomia del compartimento gastrico, approfonditi studi anatomici hanno rilevato che l'abomaso ha una forma sacciforme, con una piccola e una grande curvatura determinate da ripiegamenti dell'organo sul proprio asse longitudinale.

Due pliche di forma spiroidale formano, a livello della piccola curvatura, un piccolo corridoio. Esso prende il nome di “solco abomasale”, parte abomasale della doccia esofagea. Cranialmente, l'abomaso continua come “omaso” attraverso l'apertura omaso-abomasica. Caudalmente, si collega al duodeno attraverso il “solco pilorico”. A livello strutturale, l'abomaso è formato da quattro tonache: sierosa, muscolare, sottomucosa e mucosa. Quest'ultima si solleva e forma le pliche spiroidi (così denominate per il loro andamento a spirale), che corrono dall'orifizio omaso-abomasale a quello pilorico. La composizione della mucosa dei prestomaci e quella presente a livello abomasale è estremamente diversa. Nei primi, essa è di tipo “esofageo”, essendo costituita da epitelio pavimentoso stratificato privo di ghiandole; nell'abomaso, invece, l'epitelio è prismatico semplice e presenta una grande ricchezza di ghiandole.

Le ghiandole si classificano in quattro tipi di cellule differenti, sia sul piano morfologico che su quello funzionale:

- Cellule adelomorfe: hanno l'aspetto di cellule sierose e sono deputate alla produzione di pepsinogeno, la sostanza che si converte in pepsina in presenza di acido cloridrico
- Cellule parietali o delomorfe: disposte esternamente rispetto alle adelomorfe, sono meno numerose e di dimensioni maggiori. Sono dotate di citoplasma acidofilo, in relazione alla produzione di enzimi atti all'elaborazione dell'acido cloridrico.
- Cellule del colletto: situate tra la ghiandola gastrica e l'epitelio di rivestimento, sono caratterizzate da citoplasma ricco di mucose.
- Cellule argentaffini: si colorano di nero in presenza di sali d'argento. Sono poco numerose.



In aggiunta ai quattro tipi fondamentali di ghiandole gastriche, troviamo nell'abomaso anche una rispettabile quota di ghiandole piloriche (atte a produrre un secreto basico), e cardiali (in prossimità del cardias) [73].

La digestione comprende una notevole serie di processi diversi che trovano compimento nella conversione dei principi nutritivi degli alimenti ingeriti in molecole di minore entità più facilmente assimilabili [55].

Il processo è compiuto in primo luogo dagli enzimi secreti dalle ghiandole annesse al digerente o contenute nello spessore della sua parete. Nei prestomaci i foraggi – altrimenti inscindibili – sono resi utilizzabili dall'azione combinata della flora microbica e della fauna protozoaria.

A causa di questa popolazione, i prestomaci sono chiamati “camere di fermentazione”.

L'azione dei microrganismi ivi contenuti produce acidi grassi volatili (65% di acido acetico, 22% di acido propionico e 13% di acido butirrico), poi assorbiti e utilizzati a livello delle pareti di queste concamerazioni [51].

Tra i fattori fondamentali che regolano la dinamicità delle fermentazioni prestomacali va ricordata la motilità prestomacale, il cui fine primario è il rimescolamento e la propulsione anteriore delle sostanze ingerite.

Non è poi da sottovalutare il ruolo della saliva. L'entità della salivazione è un parametro rilevante per l'effetto tampone da essa svolto, che assicura la stabilità (valori compresi tra 5,8 e 6,8) del pH del comparto gastrico, condizione necessaria per il mantenimento della fauna batterica e l'assorbimento degli acidi grassi volatili da parte dell'epitelio ruminale.

L'ultimo fattore da ricordare qui è la quantità e la qualità degli alimenti ingeriti, che influenzano il numero e le specie di microrganismi e generano una variazione dei rapporti di concentrazione tra gli acidi grassi volatili citati.

### ***Intestino Tenue***

Dopo l'attraversamento delle prime tre concamerazioni, le ingesta arrivano all'abomaso, sono sottoposte a digestione enzimatica e sono infine convogliate nell'intestino. Si presenta, nei grandi ruminanti, con l'aspetto di un canale cilindrico muscolo-membranoso della lunghezza di circa 40 metri e del diametro di circa 5-6 centimetri. La sua funzione principale è legata alla digestione degli alimenti e all'assorbimento dei principi nutritivi.

Si considerano nel tenue i tratti del duodeno, digiuno e ileo.

La mucosa epiteliale, che lo contraddistingue, è di tipo prismatico semplice, caratterizzata dai microvilli. Essi sono espansioni digitiformi provviste - nella parte libera - di una cuticola striata e - all'interno - di una rete di capillari sanguigni, un vaso chilifero e un apparato contrattile.

La principale funzione di queste formazioni è quella di aumentare la superficie libera della cellula, e facilitare così i processi di assorbimento.

Il contenuto gastrico, altresì detto chimo, dopo aver soggiornato nei prestomaci e nell'abomaso, passa nell'intestino attraverso il piloro, dove subisce complesse azioni di natura meccanica e chimica, che ne determinano la trasformazione in chilo.

I movimenti che si possono riscontrare a livello intestinale sono di varia natura e possono essere così classificati:

- Movimenti di natura segmentatoria (dividono il contenuto intestinale in porzioni pressoché costanti).
- Movimenti di natura pendolare (rimiscolano e fanno progredire gli alimenti)
- Movimenti di natura peristaltica (permettono un avanzamento della massa intestinale attraverso la progressione di un anello di contrazione).

La parte più importante della digestione si compie proprio in questo primo tratto dell'intestino e a essa partecipano, con i loro importanti enzimi, il succo pancreatico ed il succo enterico, risultante del secreto delle innumerevoli ghiandole duodenali e intestinali.

Di fondamentale importanza è anche la funzione svolta dalla bile, la quale, pur non avendo veri e propri enzimi, compie importanti funzioni demolitive, in special modo a carico della componente lipidica presente nel contenuto intestinale.

### ***Intestino crasso***

L'intestino crasso ha la funzione di completare i fenomeni digestivi ed il soggiorno dei residui alimentari [73].

I fenomeni digestivi della componente solida dell'alimento avvengono nell'adulto sostanzialmente secondo le modalità brevemente accennate sopra. Nell'animale neonato, invece, in rapporto a un'alimentazione esclusivamente lattea nel periodo che va dalla nascita allo svezzamento, le modalità digestive sono essenzialmente connesse all'ingestione e al successivo assorbimento di una matrice liquida, peraltro unica nel suo genere e nella sua composizione biochimica.

Tale pathway assorbitivo necessita in questa sede di ulteriori approfondimenti in relazione all'interesse suscitato proprio dalle modalità attraverso cui si esplica.

Ciò che ci interessa non è solo fermarci ad analizzare la digestione della frazione proteica del colostro e del latte, ma verificare come la composizione chimica di questo alimento possa andare a modulare la presenza e la distribuzione delle acquaporine (AQPs), fondamentali per il corretto assorbimento dell'acqua.

## **MECCANISMI DI ASSORBIMENTO DELLE PRINCIPALI COMPONENTI NUTRITIVE NEL VITELLO**

### *Digestione delle proteine*

Le proteine del latte, grazie all'intervento degli enzimi proteolitici, sono assimilate sia nell'abomaso sia nell'intestino. Il corredo enzimatico dell'animale, la struttura proteica e la velocità di transito determinano l'entità della digestione proteica [74].

A livello abomasale, la caseina, componente più rappresentativa delle proteine del latte, grazie all'intervento dell'acido cloridrico presente nel succo gastrico, va incontro a coagulazione e, successivamente, a una primitiva digestione ad opera della rennina (altresì denominata chimosina) e della pepsina [71].

Sempre a questo livello la caseina subisce fenomeni coagulativi in un tempo di 3-6 minuti e, in seguito a questo processo, il grasso viene trattenuto mentre il siero (sieroproteine, lattosio e acqua) raggiunge il comparto intestinale.

Le sieroproteine (albumina e globuline), invece, sfuggendo all'azione della chimosina e della pepsina, transitano nell'intestino dove subiscono l'azione della tripsina pancreatica, enzima presente in quantità esigue alla nascita ma che aumenta nel corso della prima settimana.

La rennina, altresì anche detta caglio, in presenza di ioni calcio, determina la precipitazione delle caseine del latte sotto forma di paracaseinato di calcio (coaguli) su cui interverranno le pepsine [51].

Si può dunque dedurre che, nel vitello, la digeribilità delle proteine del latte è molto elevata. Le proteine sostitutive, al contrario, mostrano una digeribilità decisamente inferiore [74].

Nel corso della prima settimana di vita del vitello bufalino, la secrezione di acido cloridrico è piuttosto bassa e causa un aumento del pH abomasale. Poiché in condizioni d'insufficiente acidità la pepsina risulta inattiva, la coagulazione del latte e la degradazione proteica sono assicurate dall'azione della sola chimosina, attiva anche a livelli di pH più elevati rispetto alla pepsina.

La successiva riduzione del pH abomasale favorisce l'affiancamento progressivo della pepsina che sostituirà poi la chimosina nel periodo del passaggio da monogastrico funzionale a poligastrico definitivo.

I due enzimi, inoltre, conservano una diversa specificità: la chimosina risulta attiva soprattutto nei confronti della caseina, la pepsina invece è in grado di idrolizzare anche differenti substrati di natura proteica.

La diversa attività dei due enzimi giustifica pienamente la somministrazione esclusiva di latte naturale o prodotti artificiali a base di latte nei primi 7-10 giorni di vita del vitello, proprio per l'elevato contenuto in caseine di questo fondamentale nutriente.

Infatti, una somministrazione massiccia di proteine di diversa origine e, pertanto, incapaci di essere sottoposte a digestione enzimatica da parte della chimosina, causa la mancata coagulazione del latte, il passaggio di questo elemento indigerito nel comparto intestinale e la conseguente insorgenza di sintomatologia diarroica [74].

Per quanto concerne l'assorbimento intestinale delle immunoglobuline, è stato dimostrato che avviene prevalentemente nell'intestino tenue ed in particolare a livello duodenale, dove il tempo di permanenza prolungato ne consentirebbe un assorbimento completo [51].

Le macromolecole proteiche di origine colostrale giungono immutate a livello intestinale grazie alla presenza di un fattore antitriptico presente nel colostro stesso con funzione protettiva; l'agente in questione inibisce

selettivamente la digestione sia gastrica sia enterica della componente amminoacidica [75].

Pertanto, nell'intestino del vitello neonato, dopo introduzione orale del colostro o del latte, si realizza il passaggio diretto delle immunoglobuline dal digerente al torrente circolatorio, attraverso processi pinocitosici operati dai villi intestinali.

Nell'enterocita, infatti, esistono specifici recettori di membrana che in seguito al legame con le immunoglobuline si invaginano e formano delle microvescicole adibite al trasporto transmembrana dei propri costituenti.

La permeabilità intestinale dopo la nascita si riduce progressivamente. Il passaggio delle immunoglobuline attraverso la barriera intestinale e il successivo trasferimento al torrente ematico si verifica in maniera ottimale nelle prime 24 ore di vita [76].

### *Digestione dei glucidi*

L'attività amilolitica del succo pancreatico è piuttosto scarsa, mentre aumenta a partire dai due mesi di vita.

Il lattosio rappresenta il principale esponente della categoria dei glucidi del latte (35- 40% sul secco). Seguono l'amido (2-10%) e il saccarosio (1-2%) [74].

Il lattosio è degradato nel tratto duodenale da una specifica lattasi ed è importante ricordare che, già alla nascita, esso è dotato di una quasi totale digeribilità (99%).

Altri glucidi come gli amidi (2-10%), i derivati amilacei (destrine, maltosio) ed il saccarosio (1-2%), presenti anche nei latti sostitutivi, mostrano, nei primi giorni di vita, una digeribilità ridotta, che tende ad aumentare con il tempo.

Poiché il corredo enzimatico glicolitico del vitello incrementa con l'accrescimento e con lo sviluppo delle specializzazioni dei vari tratti intestinali, è consigliato prima delle otto settimane di vita contenere l'apporto di amidi con la dieta e di fornire tali elementi entro range approssimativi dell'8- 12% sul secco della razione.

Una somministrazione eccedente tali limiti induce un accumulo di composti glucidici a livello intestinale. Tale raccolta favorisce l'insorgenza di fermentazioni microbiche anomale che si rendono responsabili di forme diarroiche [71].

I prodotti terminali liberati per idrolisi enzimatica del lattosio, quali glucosio e galattosio, vengono riversati nel torrente ematico velocemente. Differentemente, alcuni carboidrati che sfuggono all'azione enzimatica possono subire a livello dell'intestino crasso fermentazioni che portano alla formazione di AGV (acido acetico, acido propionico e acido butirrico), acido lattico e gas.

Questi composti risultano fortemente coinvolti nel determinismo di forme diarroiche cosiddette "alimentari", conseguenti ad somministrazione eccessiva e precoce di alimenti amilacei [74].

### *Digestione dei lipidi*

I lipidi sono sottoposti a idrolisi parziale ad opera sia di una esterasi pregastrica salivare sia di una lipasi gastrica a livello abomasale.

Il ruolo fondamentale della digestione dei grassi è senza dubbio quello svolto dalla lipasi pancreatica, in grado di idrolizzare i trigliceridi in acidi grassi liberi, monogliceridi e digliceridi [74].

L'esterasi pregastrica scinde il butirrato, elemento notevolmente presente nel grasso del latte; questa modalità assorbitiva precoce è alla base

della semplicità con cui vengono assorbiti i lipidi presenti naturalmente nel latte e avvalora la difficoltà di digestione di altre tipologie di grasso quale sego, strutto, olii vegetali, addizionati ai latti sostitutivi, che risultano pertanto scarsamente digeribili.

L'esterasi pregastrica, secreta a livello delle ghiandole salivari, è stimolata dall'assunzione di latte. Peraltro, la velocità della sua secrezione è correlata direttamente alla lentezza nell'assunzione di latte.

Una buona coagulazione del latte e una prolungata ritenzione dei coaguli a livello abomasale favorisce l'attività lipolitica di questo enzima. Di contro, tutti i fattori che accelerano il transito dei lipidi a livello intestinale, come una massiva presenza di proteine incoagulate, influiscono negativamente sulla digeribilità dei grassi [71].

La capacità assorbitiva dei grassi dipende anche dalla natura stessa degli elementi lipidici.

I lipidi presenti nel latte, caratterizzati da acidi grassi a catena corta, sono di gran lunga meglio digeribili rispetto a quelli a catena lunga, come ad esempio il sego, costituito prevalentemente da acido palmitico e stearico.

Come nei monogastrici, i grassi non subiscono nel tratto intestinale del vitello modificazioni significative in seguito ai processi digestivi e assimilativi. Essi sono in grado di diffondersi preferenzialmente nella linfa e - attraverso la vena porta - depositarsi come grassi corporei [74].



## ACQUAPORINE NELL'APPARATO DIGERENTE

Grandi quantità di liquidi sono trasportati nel tratto gastrointestinale per la secrezione della saliva, del succo gastrico, della bile e del succo pancreatico e per l'assorbimento di liquidi attraverso la parete intestinale.

Per quanto riguarda il passaggio di liquidi è importante sottolineare che l'apparato gastrointestinale è secondo soltanto al rene, dove 180 litri di liquidi al giorno (nell'uomo) sono filtrate dal glomerulo e successivamente processati nel nefrone.

Prendendo come esempio l'uomo e l'importanza del movimento di fluidi nell'apparato digerente è utile ricordare ad esempio che le ghiandole salivari producono cinque litri di liquidi al giorno, lo stomaco secerne dai due ai cinque litri di succo gastrico, il fegato produce fino a cinque litri di bile, il pancreas produce da uno a cinque litri di succo pancreatico.

Per quanto riguarda l'assorbimento, il piccolo intestino assorbe circa sei litri di fluidi mentre il colon assorbe da uno a tre litri di liquidi contro gradiente [77].

Questi valori rappresentano il trasporto netto dei fluidi attraverso i vari distretti. Essi risultano più bassi prendendo in considerazione il trasporto unidirezionale.

I liquidi trasportati attraverso gli epiteli e gli endoteli dei vari tratti del digerente risultano composti da sali (mM 150) ed acqua (mM 55000).

Anche se le proteine coinvolte nel trasporto dei sali sono state studiate per anni, solo recentemente si è iniziato a porre l'attenzione sui meccanismi molecolari che regolano il trasporto dell'acqua.

Molti sono stati i lavori pubblicati in merito alla struttura, alla localizzazione e all'espressione delle acquaporine; tuttavia, si conosce davvero poco sul ruolo specifico di ognuna e della loro importanza nei meccanismi fisiologici di regolazione.

Il trasporto dei fluidi nel tratto gastrointestinale come negli altri organi dipende dalle forze osmotiche legate al riassorbimento dei sali e dalle differenze di pressione idrostatica. E' dimostrato che un simile meccanismo esiste nelle ghiandole salivari negli acini pancreatici e a livello intraepatico.

In organi come il rene e in altri epitelii, dove avviene una secrezione o un assorbimento di fluidi isoosmotico, a una maggiore permeabilità all'acqua corrisponde un maggior movimento di fluidi [78]

Nel piccolo intestino e nel colon la situazione è più complicata; studi sulla perfusione hanno mostrato che i segmenti prossimali del piccolo intestino hanno una maggiore permeabilità osmotica rispetto a quelli distali [79].

Il duodeno e il digiuno prossimale sono altamente permeabili all'acqua in modo tale da permettere un rapido equilibrio osmotico del contenuto intestinale [80]. Il piccolo intestino mostra un epitelio estremamente convoluto a bassa resistenza elettrica e a basso coefficiente di riflessione per i piccoli soluti. Si ritiene che i movimenti rapidi a questo livello, avvengano per via paracellulare e ciò è confermato dalla bassa permeabilità osmotica delle vescicole dell'orletto a spazzola nel piccolo intestino [81].

In ogni caso, questi studi non hanno considerato le possibili differenze di permeabilità dei differenti tratti del piccolo intestino.

Nel colon l'acqua deve fuoriuscire dal lume vincendo l'opposizione dell'alta osmolarità delle feci. Sono stati proposti diversi meccanismi che coinvolgevano modelli a tre compartimenti con gradienti fissi oltre ad un meccanismo di concentrazione controcorrente [82]. In ogni caso la

localizzazione anatomica nei vari compartimenti, ammesso che questi esistono, non è stata definita così come non esiste un'evidenza diretta di un moltiplicatore a controcorrente simile a quello renale.

Il colon ha un epitelio sottile con una resistenza elettrica superiore al piccolo intestino e probabilmente una minore permeabilità paracellulare all'acqua. Diversi studi hanno mostrato che le cripte sarebbero il principale sito di assorbimento e secrezione di fluidi stimolata da agonisti [83].

Un'ipotesi interessante proposta da Naftalin è che i soluti siano trasportati attivamente al di fuori della cripta attraverso una barriera relativamente impermeabile all'acqua, in modo da creare uno spazio interstiziale ipertonico [84]. A quel punto la pressione negativa creata nella cripta riassorbe acqua dalle feci producendo materiale fecale compatto e disidratato. Non è chiaro se l'epitelio di superficie del colon giochi un ruolo nel movimenti dei fluidi.

Da quando sono state scoperte le acquaporine particolare attenzione è stata prestata al loro ruolo nel trasporto dell'acqua a livello intestinale [85]. Nell'epitelio intestinale esistono due meccanismi di trasporto dell'acqua: quello cellulare, attraverso gli spazi tra le giunzioni cellulari, e quello trans-cellulare attraverso la membrana cellulare e basolaterale [86].

I due meccanismi non sono completamente indipendenti in quanto gli spazi intercellulari laterali rappresentano un compartimento dove possono agire entrambi [87].

Indipendentemente dal meccanismo utilizzato, l'acqua deve attraversare i capillari di membrana per essere drenata nel (o dal) circolo sanguigno [88].

In base alla resistenza elettrica delle giunzioni cellulari l'epitelio gastrointestinale è stato classificato in tre gruppi in base alle dimensioni delle giunzioni tra gli enterociti [89]:

- Strette (fondo gastrico)
- Intermedie (antro gastrico e colon)
- Larghe (piccolo intestino)

La via paracellulare è stata a lungo considerata la principale via di assorbimento dell'acqua accoppiata a quella dei nutrienti. Ora, invece, tale meccanismo di trasporto appare limitato specialmente nell'epitelio a giunzioni larghe (piccolo Intestino) [90]. La via trans-cellulare prevede il passaggio dell'acqua, attraverso le membrane apicali e basolaterali delle cellule epiteliali [91].

Questo può avvenire attraverso tre meccanismi:

- Bilayer fosfolipidico
- Cotrasporto con ioni e nutrienti vari
- La diffusione mediante canali per l'acqua AQP [85].

L'entità del ruolo di cotrasportatori delle acquaporine nel passaggio trans-cellulare dell'acqua è ancora in discussione [92].

In particolare è accettato che le AQPs sono responsabili di movimenti osmotici transmembranari mentre la presenza di un trasporto attivo (contro gradiente osmotico) è più controversa e richiede ulteriori esperimenti [93].

Nonostante siano passati parecchi anni dalla scoperta delle acquaporine, la loro espressione, localizzazione e ruolo nel tratto gastrointestinale non sono stati ancora chiariti e ciò è dovuto a due principali problemi:

1) Contrariamente ad altri trasportatori i risultati ottenuti negli animali non sembrano sovrapponibili nell'uomo. Ad esempio l'acquaporina 6 è stata evidenziata nel ratto ma non è stata scoperta ancora nell'uomo.

2) La comune coespressione di più tipi di acquaporine rende più difficile la comprensione del contributo di ogni isoforma nel flusso d'acqua.

Nella mucosa intestinale sono presenti 4 tipi di cellule epiteliali: goblet, paneth, endocrine ed enterociti.

Il ruolo delle cellule di goblet e paneth nel trasporto intestinale di acqua e soluti è ancora ignoto [91].

Le cellule endocrine non sono direttamente coinvolte nel trasporto di sali e fluidi anche se secernono una serie di ammine e peptidi importanti per la sua regolazione in relazione al contenuto intestinale [91].

Gli enterociti sono quindi i principali attori nel movimento bidirezionale di grandi volumi di acqua.

Gli enterociti immaturi, localizzati nella parte più profonda delle cripte, secernono nel lume intestinale sodio, cloro e acqua che vengono poi riassorbiti tra gli enterociti maturi, più superficiali. L'espressione delle acquaporine nelle zone superficiali del villo suggerisce un ruolo nell'assorbimento piuttosto che nella secrezione dell'acqua.

## AQP<sub>1</sub>

L'AQP<sub>1</sub> è ampiamente espressa nell'endotelio continuo dei capillari. L'AQP<sub>1</sub> è presente nelle cellule endoteliali dei capillari e nei piccoli vasi del sistema digerente inclusi la vescica e il pancreas [94] [95].

Il trasferimento trans-endoteliale di acqua sembra avvenga attraverso l'AQP<sub>1</sub> in questi vasi e al livello del piccolo intestino; l'AQP<sub>1</sub> è anche presente nel vaso chilifero e a livello delle cellule endoteliali del villo.

I vasi chiliferi sono coinvolti nel trasporto dei chilomicroni prodotti durante il processo digestivo [96] e l'AQP<sub>1</sub> potrebbe essere coinvolta.

Nei colangiociti epatici e biliari, l'AQP<sub>1</sub> è localizzata non solo a livello delle membrane apicali e basolaterali ma anche nel citoplasma [94] [95] [97].

L'AQP<sub>1</sub> citoplasmatica è inserita nella membrana apicale, dipende dalla secretina ed è importante per la formazione di bile [98].

Nel pancreas l'acquaporina 1 è espressa nei dotti intralobulari e interlobulari [99] e sembra avere un ruolo nel trasporto transcellulare di acqua. Di conseguenza l'AQP<sub>1</sub> gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo dei grassi assunti con la dieta, partecipando alla produzione di bile, di succo pancreatico e all'assorbimento di chilomicroni.

A conferma di questa ipotesi è stata rilevata una alterazione del metabolismo dei grassi nei topi AQP<sub>1</sub> null [95]. Il difetto del metabolismo dei grassi di origine alimentare sembra più legato a una maladigestione che a un cattivo assorbimento [95]. In ogni caso sono necessari ulteriori studi nel determinare l'importanza fisiologica dell'acquaporina 1.

### AQP<sub>3</sub>

L'espressione dell'AQP<sub>3</sub> è aumentata dall'ipertonicità e dall'iperosmolarità; facendo parte al gruppo delle acquagliceroporine è permeabile anche all'urea e al glicerolo [29] [25].

L'AQP<sub>3</sub> è anche ampiamente espressa nelle cellule epiteliali degli apparati respiratorio, digerente, urinario e tegumentario [24].

L'AQP<sub>3</sub> è abbondantemente espressa nell'epitelio stratificato nel tratto digerente superiore (dalla cavità orale alla porzione non ghiandolare dello stomaco) e nell'epitelio semplice e stratificato nella parte inferiore (dal colon distale fino all'ano).

Nella cavità orale, esofago, stomaco e ano l'AQP<sub>3</sub> è presente in abbondanza nelle cellule basali e intermedie dell'epitelio stratificato ed è localizzata lungo la membrana plasmatica.

La maggior parte del sistema digerente, dallo stomaco ghiandolare fino ad arrivare al retto, è ricoperto da un epitelio semplice colonnare. Nello stomaco ghiandolare si sono osservate tracce di AQP<sub>3</sub> a livello della membrana basolaterale e delle cellule mucose di superficie. La sua espressione dipende dalla profondità della fossa gastrica. Le cellule dello stomaco ghiandolare non presentano AQP<sub>3</sub>.

Nel piccolo intestino l'AQP<sub>3</sub> si trova raramente e solo all'apice dei villi. Nel grosso intestino essa è presente nel colon distale e nel retto ed è localizzata a livello della membrana basolaterale delle cellule epiteliali di assorbimento che affacciano direttamente nel lume e a livello del collo delle cripte. Le cellule poste alla base delle cripte risultano negative per l' AQP<sub>3</sub>. E' assente anche nel cieco e nel colon prossimale.

Sia a livello orale che anale, l'epitelio mostra la presenza dell'AQP<sub>3</sub> ed è in continuazione con quello cutaneo. L'importanza fisiologica dell'AQP<sub>3</sub> nella cute è stato dimostrato nei topi AQP<sub>3</sub>-null che presentavano una ridotta idratazione dello strato corneo e dell'elasticità cutanea [100]. Un ruolo simile potrebbe esistere anche per il tratto digerente. Un altro possibile ruolo dell'AQP<sub>3</sub> potrebbe essere il movimento transepiteliale di fluidi verso la lamina propria come meccanismo dell'assorbimento intestinale di acqua, anche se i canali idrici apicali non sono stati ancora identificati.

#### AQP<sub>4</sub>

L'Acquaporina 4 (AQP<sub>4</sub>) è una proteina canale altamente selettiva per l'acqua ed è stata isolata per la prima volta nel rene e nel polmone [26] [11].

Per quanto riguarda l'apparato digerente dell'uomo, l'AQP<sub>4</sub> è espressa nello stomaco e nell'intestino ed è presente a livello della membrana basolaterale, delle cellule parietali nello stomaco, mostrando una maggiore espressione a livello delle cellule parietali della fossa gastrica [101] [102].

L'espressione specifica dell'AQP<sub>4</sub> a livello delle cellule parietali suggerisce un ruolo nella secrezione acida gastrica. Studi su topi AQP<sub>4</sub>-knockout, tuttavia, non hanno evidenziato differenze sostanziali nella secrezione gastrica, nel pH gastrico, nelle concentrazioni di gastrina, o nella morfologia della mucosa gastrica rispetto al gruppo controllo [102].

Nel piccolo intestino, l'AQP<sub>4</sub> è localizzata a livello della membrana basolaterale delle cellule delle cripte situate alla parte inferiore.

Nel colon l'AQP<sub>4</sub> è localizzata a livello della membrana basolaterale delle cellule epiteliali superficiali, dove potrebbe svolgere un ruolo nel trasporto dei fluidi a livello di questa porzione, ipotesi dimostrata nel topo AQP<sub>4</sub>-knockout



[102]. La distruzione dell'AQP4 porta una riduzione di permeabilità all'acqua nel colon prossimale ma non in quello distale quindi il contenuto idrico delle feci è quindi maggiore nei topi AQP4-knockout rispetto ai topi-wild-type; quello del cieco non presenta differenze significative.

La distruzione dell'AQP4 non influisce sulla secrezione di acqua stimolata dalla teofillina a livello del colon. Questi risultati lasciano pensare che l'AQP4 partecipa ai movimenti transcellulari dell'acqua attraverso le cellule epiteliali superficiali nel colon. In ogni caso, le cellule di superficie giocano un ruolo di poco conto nell'assorbimento della porzione idrica fecale e nella secrezione fluida colica.

### **AQP5**

L'AQP5 è stata isolata nelle ghiandole salivari, è un canale selettivo per l'acqua ed è espressa nei tessuti ghiandolari come quelli salivari, lacrimali e sudoripari [103]; [104]. Per quanto riguarda la localizzazione immunoistochimica è stata analizzata nelle ghiandole sottomandibolari, parotidiche e sublinguali del ratto [105]; [104].

L'AQP5 è presente negli acini secretori. L'analisi al microscopio confocale ha chiaramente dimostrato che essa è localizzata nella membrana apicale inclusi i canalicoli secretori intercellulari delle cellule acinose.

Questa osservazione suggerisce che l'AQP5 gioca un ruolo nei processi di secrezione salivare. Nella ghiandola sottomandibolare la maggior parte dell'AQP5 si trova lungo la membrana apicale nelle cellule dei dotti intercalari oltre che nelle cellule acinose. I dotti intercalari potrebbero partecipare al trasferimento di acqua nella formazione della saliva. Nelle altre ghiandole salivari l'AQP5 è presente solo nelle cellule acinose. Al fine di studiare il ruolo

fisiologico dell'acquaporina 5 sono stati creati ed analizzati topi transgenici privi di essa [106] [107] .

La stimolazione salivare con pilocarpina risultava ridotta nei topi AQP5 knock-out e la saliva, se comparata a quella dei topi wild-type, si mostrava ipertonica e più viscosa. Nella parotide e nelle ghiandole sublinguali la permeabilità all'acqua era significativamente diminuita nei topi knock-out. Ciò dimostra che l'AQP5 gioca un ruolo chiave nella secrezione salivare a livello della membrana apicale delle cellule acinose.

Ishikawa [108], trattando tessuti di paratiroidi di ratto con acetilcolina, ha dimostrato che l'AQP5 è traslocata dalla membrana intracellulare alla membrana apicale. Al contrario, altri studi non sono riusciti a dimostrare la presenza dell'AQP5 nel citoplasma. L'apparente contraddizione potrebbe essere giustificata da un possibile mascheramento dei siti antigenici dell'AQP5 citoplasmatici.

L'espressione dell'AQP5 è stata dimostrata anche nell'apparato digerente del gatto a livello di stomaco e duodeno oltre che a livello delle ghiandole salivari [104].

Nello stomaco, essa è presente a livello della ghiandola pilorica (in particolare a livello della membrana apicale delle cellule secretorie), mentre è assente nelle ghiandole del fondo.

Nel duodeno si trova solo a livello ghiandolare e sempre sulla membrana apicale delle cellule secretorie. La particolare localizzazione riscontrata in questa specie potrebbe suggerire che l'AQP5 occupa un ruolo cruciale nella secrezione dei fluidi in questi distretti. Altri tratti del digerente sono risultati negativi all'analisi immunoistochimica ma l'AQP5 è risultata comunque dalle indagini effettuate con RT-PCR [104].

E' sempre importante sottolineare che molte patologie di interesse sono legate ad alterazioni dei canali per l'acqua come il diabete insipido, causato da una mutazione dell' AQP2 [109] e la sindrome di Sjogren, legata ad una mutazione dell' AQP5 [110] [111].

### **AQP7**

L'acquaporina 7 è stata scoperta per la prima volta nel testicolo di ratto [112]. E' permeabile all'acqua ma anche a piccole molecole come glicerolo, urea e composti arsenicali [112]. Tramite northern blot l'mRNA dell'AQP7 è stato ritrovato nel ratto a livello renale, cardiaco, muscolare, adiposo e intestinale [112].

Studi recenti hanno mostrato la presenza dell'AQP7 a livello delle cellule superficiali sia nel piccolo che nel grosso intestino ed hanno ipotizzato il coinvolgimento di tale acquaporina nel trasferimento di acqua e piccole molecole attraverso l'epitelio intestinale.

A parte questi studi preliminari, il ruolo dell'AQP7 a livello intestinale è ben lungi dall'essere elucidato.

### **AQP8**

L'AQP8 è stata isolata nel fegato e nel testicolo. Il suo mRNA è presente in tutto il sistema digerente incluse ghiandole salivari, piccolo intestino, colon e pancreas.

Elkjaer [113] ha dimostrato che l'AQP8 è localizzata a livello delle cellule mioepiteliali che circondano le cellule acinose duttali delle ghiandole parotide, sottomandibolare e sottomandibolare. Studi di Wellner sul ratto [114] hanno

localizzato l'AQP8 sulla membrana basolaterale delle cellule acinose della ghiandola sottomandibolare.

Nell'intestino essa è presente nell'epitelio di assorbimento del duodeno, digiuno e colon, principalmente localizzata a livello sub-apicale intracellulare. [115] [113] [116]. Sembra quindi non intervenire nel trasferimento transcellulare di acqua.

Nel fegato essa si trova negli epatociti ed è localizzata sia a livello della membrana apicale che nel compartimento intracellulare [115] [113] [114] [116]. Garcia et al 1964 hanno dimostrato, negli epatociti di ratto, che l'AQP8 è presente in vescicole intracellulari e può essere diffusa, attraverso la membrana plasmatica, tramite un sistema di microtubuli stimolato dell'cAmp.

Elkjaer ha ipotizzato un suo coinvolgimento nell'omeostasi intracellulare piuttosto che nel trasferimento transcellulare di acqua. Nel pancreas essa è presente nella regione apicale delle cellule acinose, particolarmente in vescicole intracellulari della regione subapicale. E' stato ipotizzato un suo possibile ruolo nella secrezione di succo pancreatico.

### **AQP9**

L'AQP9 è stata isolata nei leucociti umani [117] e nel fegato di ratto [118]. Si trova inoltre nel fegato, milza, polmone e testicoli [117] [118].

Fa parte delle acquagliceroporine e trasporta acqua e soluti neutri come urea e glicerolo [118]. Nel fegato si trova sulla superficie sinusoidale della membrana degli epatociti e sembra avere un ruolo nell'uptake del glicerolo dal sangue ai sinusoidi. Il glicerolo è il substrato per la gluconeogenesi epatica ed è rilasciata dalle cellule adipose nel sangue tramite AQP7 [119].

A digiuno l'espressione dell'AQP7 e AQP9 aumenta in seguito al maggior rilascio di glicerolo dalle cellule adipose e di conseguenza, aumenta la sua captazione a livello degli epatociti [120] [121].

Riprendendo l'alimentazione, l'espressione dell'acquaporine si riduce nuovamente. Nel piccolo intestino Okada et al hanno mostrato che l'AQP9 è localizzata a livello della membrana basolaterale delle cellule caliciformi e hanno ipotizzato che essa sia coinvolta nella sintesi o nella secrezione di una sostanza mucosa che protegge la superficie intestinale e rende il flusso del contenuto intestinale più morbido [122].

### **AQP 10**

L'AQP 10 è espressa soltanto nel piccolo intestino [123] nel topo. E' uno pseudogene e nessun transcript è stato trovato nel digiuno [124].

L' AQP<sub>10</sub> è stata isolata e localizzata anche nel piccolo intestino dell'uomo, dove si pensa possa svolgere un ruolo importante nel trasporto di acqua e piccoli soluti [125].

TAVOLA 1

## MODELLO DI SCAMBIO ACQUOSO NELL'APPARATO DIGERENTE

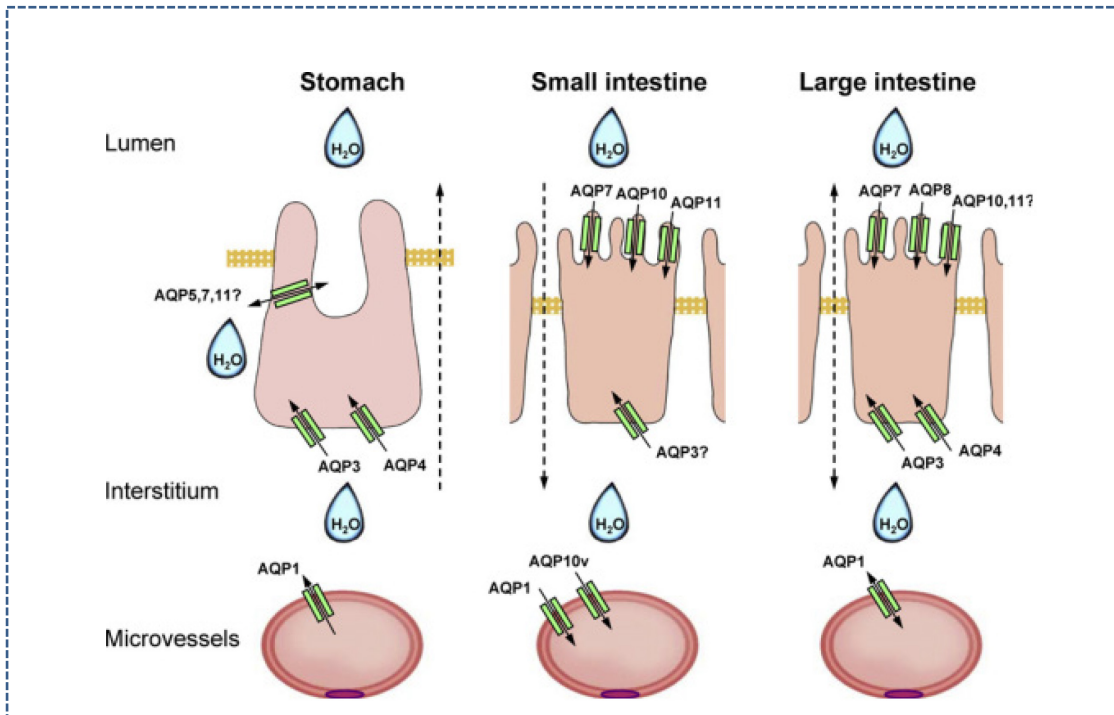


Figura 4: Tratto da: Molecular Aspects of Medicine Laforenza U (2012) 33 642–650

*Il cotrasporto di acqua con ioni e nutrienti non è stato considerato in questo modello. Il movimento dell'acqua attraverso le cellule epiteliali gastrointestinali per via paracellulare (linee tratteggiate) e attraverso la via transcellulare (acquaporine, AQP). [126]*

*Nello stomaco l'acqua si muove principalmente nella direzione di secrezione (dall'interstizio al lume) e l'AQP<sub>3</sub> e AQP<sub>4</sub> sono localizzate nella porzione basolaterale.*

*Nel Piccolo intestino, l'acqua si muove principalmente nella direzione di assorbimento (dal lume interstizio). AQP<sub>7</sub>, AQP<sub>10</sub> e AQP<sub>11</sub> sono localizzati nella porzione apicale*

*Grosso Intestino: l'acqua si muove sia nella direzione di assorbimento che in quella di secrezione. AQP<sub>7</sub>, AQP<sub>8</sub> sono localizzate nella parte apicale, AQP<sub>3</sub> e AQP<sub>4</sub> sulla porzione basolaterale.*

## PARTE SPERIMENTALE

### *Scopo della ricerca*

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare il possibile coinvolgimento del colostro nella modulazione e l'espressione delle acquaporine nei vari tratti dell'apparato digerente del vitello bufalino.

La ricerca si è incentrata sull'espressione e la distribuzione dell'AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub> in relazione al tipo e alla qualità dell'alimento somministrato, ponendo particolare attenzione sugli effetti che il colostro esercita a livello tissutale.

I processi di assorbimento del colostro, durante le prime fasi di vita del vitello, rappresentano un punto cruciale nella determinazione di tutti quei meccanismi fondamentali per la loro protezione contro i patogeni intestinali, principali responsabili della mortalità neonatale.

Molteplici meccanismi, compreso l'attivazione degli enzimi e/o di alcune proteine canale come le acquaporine (AQPs), non sono ancora ben noti e non sembrano partecipare a tali processi.

Il colostro, inoltre, rappresenta per il vitello un alimento a elevato valore nutrizionale contenente fattori di accrescimento e ormoni di sviluppo che possono favorire il corretto sviluppo dell'apparato gastroenterico.

Lungo i vari tratti dell'intestino, infatti, un gran numero di molecole d'acqua e di altre sostanze transitano attraverso le pareti intestinali e regolano l'equilibrio osmotico del contenuto intestinale soprattutto dopo i pasti.

Le AQPs presenti a livello intestinale sono proteine strutturali espresse sulla superficie della cellula.

Esse formano canali proteici specifici per il passaggio bidirezionale di acqua e piccoli soluti tra l'ambiente interno e quello esterno alla cellula,

facilitano la secrezione e il riassorbimento dei fluidi, regolano il volume cellulare e lo stato di idratazione dei tessuti.

La loro localizzazione e distribuzione nell'apparato digerente sta suscitando notevole attenzione da parte della ricerca scientifica, che mira a comprendere la loro funzione specifica in un sistema dove avviene un consistente trasporto di acqua e di altre molecole indispensabili alla vita.

Lavori recenti, infatti, hanno evidenziato una distribuzione non uniforme delle acquaporine lungo il tratto gastrointestinale suggerendo così una possibile differenza funzionale nei diversi tratti.

Partendo da queste premesse, l'obiettivo del nostro lavoro si propone di studiare l'espressione e la localizzazione dell'AQP1, AQP4 e AQP5 lungo l'apparato intestinale del vitello bufalino valutando gli ipotetici effetti del colostro sulla loro espressione.

Per la valutazione dell'espressione dell mRNA e delle proteine è stata utilizzata RT- PCR e il Western- Blotting mentre per la localizzazione cellulare le tecniche di immunoistochimica.



## ***Materiali e metodi***

### *Scelta dei soggetti e raccolta dei campioni*

Per il nostro studio sono stati utilizzati venti vitelli bufalini sani e di sesso maschile distinti in 4 gruppi (n. 5 soggetti per gruppo):

- 1) Vitelli che non avevano assunto mai alcun tipo di alimento) (TO);
- 2) Vitelli ad una settimana dall'assunzione di colostro (T<sub>1</sub>);
- 3) Vitelli ad una settimana dall'assunzione di solo latte (T<sub>2</sub>).
- 4) Vitelli (~15 mesi) al fine di ottenere uno standard di riferimento per la specie (T<sub>3</sub>).

Tutti gli animali sono stati sacrificati al macello e da essi è stato prelevato il tratto intestinale. A ciò ha fatto seguito la dissezione dei segmenti che sono stati immediatamente divisi in aliquote e trattati diversamente in funzione della metodica impiegata.

Nel gruppo che aveva assunto il colostro è stato inoltre monitorato il trasferimento dell'immunità passiva attraverso la valutazione delle IgG plasmatiche a 3h, a 15h, a 27h e a 48h, rispettivamente, dopo l'inizio dell'esperimento.

La cavità addominale è stata incisa subito dopo la macellazione ed i tratti gastrointestinali (GIT) sono stati asportati. I campioni di tessuto sia del piccolo (duodeno, digiuno, ileo) che del grosso intestino (cieco e colon) sono stati adeguatamente raccolti e processati per la fissazione (immunoistochimica) o congelati in azoto liquido e successivamente conservati a -80 °C fino al loro uso per l'estrazione delle proteine e dell' RNA totale. Tutte le procedure adoperate si sono svolte nel totale rispetto della normativa vigente riguardo l'adozione delle specie animali nella ricerca scientifica.

### *Immunoistochimica*

I campioni freschi dei tessuti dell'intestino sono stati fissati con soluzione di Bouin (6-24 h), inclusi in paraffina e successivamente tagliati ad uno spessore di 5-7  $\mu\text{m}$ .

La metodica immunoistochimica, basata sull'impiego del complesso avidina-biotina-perossidasi, è stata effettuata utilizzando il kit ABC della Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Le sezioni sono state sparaffinate in xilene e successivamente idratate in soluzioni seriali di etanolo.

Dopo la sparaffinatura e la reidratazione delle sezioni si è proceduto, al blocco delle perossidasi endogene immergendo le sezioni in una soluzione di perossido di idrogeno al 3% per 30 min, per impedire reazioni aspecifiche è stato effettuato un pre-trattamento con siero di coniglio 1.5% (Vector) di tampone fosfato (PBS) 0.01 M. (pH 7.2) per 30 min.

Successivamente a seconda dell'Acquaporina da analizzare le sezioni sono state incubate in camera umida con:

- 1) **AQP1** un anticorpo policlonale di capra anti-AQP1 (sc-9879) diluito 1:200 per tutta la notte a 4 °C.
- 2) **AQP4** un anticorpo policlonale di capra anti-AQP1 (sc-9888) diluito 1:100 per tutta la notte a 4 °C.
- 3) **AQP5** Le sezioni di ogni campione sono state incubate in camera umida con un anticorpo policlonale di capra anti-AQP1 (sc-9891) diluito 1:100 per tutta la notte a 4 °C.

In seguito a lavaggio in PBS, per eliminare l'anticorpo in eccesso non legato, le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario anti IgG di capra biotinilato diluito 1:200 per 30 min a temperatura ambiente.

Trascorsi i 30 min. si è provveduto a lavare ulteriormente le sezioni in PBS le quali sono state incubate per 30 min con l' ABC (laboratori Vector, Burlingame, CA, S.U.A.) preparato al momento.

La localizzazione dell'immunoreattività è stata visualizzata incubando le sezioni per 5 minuti nella soluzione appena preparata di diaminobenzidina-nichel DAB (laboratori Vector, Burlingame, CA, S.U.A.).

La specificità dell'immunoreattività è stata saggiata sostituendo l'anticorpo primario con un buffer ed ottenendo così un controllo negativo. Nessuna immunoreazione è stata rilevata nelle prove di controllo.

La specificità dell'anticorpo primario è stata testata tramite il pre-assorbimento di un antigene omologo in eccesso ed usando la tecnica del dot blot.

Per l'osservazione dell'immunoreattività sono stati esaminati cinque vetrini per ogni singolo tratto intestinale di ogni animale e sono stati valutati indipendentemente da due osservatori usando un microscopio di Leica DMRA2 (microsistemi Wetzlar, Germania di Leica).

### *Western blot*

Tessuti opportunamente congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sono stati omogenati in RIPA buffer a  $4^{\circ}\text{C}$  (0.1 mM PBS, 1% Nodinet P-40, 0.1% SDS, 0.05% deoxycholate, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMSF), centrifugati a  $15,000\times g$  per 15 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentrazione proteica dei surnatanti dei campioni è stata determinata mediante metodica di Bradford utilizzando l'albumina serica bovina (BSA) come standard (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

Gli omogenati, fino al loro utilizzo, sono stati conservati a  $-70^{\circ}\text{C}$ . 50  $\mu\text{g}$  di proteine totali sono state solubilizzate in Laemmli buffer (2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 66 mM TRIS pH 7.5, 10 mM EDTA) e separate su gel al 12% (SDS poliacrilamide). Dopo la separazione delle frazioni proteiche mediante SDS-page, le stesse sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa (PROTRAN, BioScience, Germany).

Per l'evidenziazione della proteina d'interesse, dopo l'incubazione del filtro (1 ora) con latte milk (non-fat dry) 5% in tampone TBST (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 0.3% Tween-20) a  $4^{\circ}\text{C}$  per tutta la notte, la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario specifico per ogni Acquaporina esaminata:

- 1) anti-AQP1 (sc-9879) diluito 1:200 o con l'anticorpo anti beta-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA) diluito con TBST contenente 2,5% di latte per due ore a temperatura ambiente.
- 2) anti-AQP4 (sc- 9888) diluito 1:200 o con l'anticorpo anti beta-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA) diluito con TBST contenente 2,5% di latte per due ore a temperatura ambiente.

- 3) anti-AQP5 (sc-9891) diluito 1:200 o con l'anticorpo anti beta-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA) diluito con TBST contenente 2,5% di latte per due ore a temperatura ambiente.

Dopo opportuno lavaggio in TBST la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario anti IgG di capra coniugato con perossidasi (dil 1:2000 con TBS-T contenente 2,5% di latte).

Dopo lavaggi in TBST l'evidenziazione della proteina di interesse è stata realizzata mediante chemiluminescenza (SuperSignalWest Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific Pierce, IL ) e l'immagine è stata acquisita con l'apparecchiatura Kodak Gel Logic 1500 (Celbio, Milano Italy).

Per la determinazione del peso molecolare delle proteine, è stato utilizzato un marker di proteine (ProSieve, Lovra).

Inoltre, sono stati effettuati degli esperimenti di controllo di specificità degli anticorpi primari mediante adsorbimento omologo. Per confermare la specificità, le membrane sono state inoltre incubate in presenza dell'anticorpo primario pre-adsorbito (pre-absorption control) con eccesso di antigene omologo.

Per effettuare questo controllo l'anticorpo per l' AQP1, dell'AQP4 e dell'AQP5 sono stati diluiti 1:500 (0.4 µg/mL) e incubato con il peptide in eccesso in un piccolo volume (500 µL) di TBS per tutta la notte a 4°C prima di incubarlo con la membrana.

Per ottenere una stima della concentrazione proteica abbiamo voluto eseguire un'analisi densitometrica dei vari blot grazie all'utilizzo della Odissey® Imaging System-Li-Cor Biosciences, NE . A tal fine, ciascun blot è stato "strippato" e incubato con l'anticorpo anti-actina.

L'espressione numerica è stata definita dal rapporto densitometrico tra il valore medio (riferito a tre repliche dello stesso campione) rispettivamente;

- 1) dell' AQP<sub>1</sub> vs il valore medio del la  $\beta$ -actina.
- 2) dell'AQP<sub>4</sub> vs il valore medio del la  $\beta$ -actina
- 3) dell' AQP<sub>5</sub> vs il valore medio del la  $\beta$ -actina

Per la valutazione statistica delle differenze tra gruppi che avevano assunto latte o colostro, è stato applicato il t di Student e i valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

### *Estrazione dell' RNA, sintesi del cDNA, RT-PCR e sequenziamento*

I campioni di tessuto sono stati omogeneizzati in TRI-Reagent (sigma, St. Louis, Mo, S.U.A.) su ghiaccio mediante l'omogeneizzatore Ultra-Turrax.

Dopo l'estrazione in cloroformio e la precipitazione con alcol isopropilico, l'RNA è stato solubilizzato in acqua DEPC.

L'RNA totale è stato misurato con un Eppendorf Biophotometer (Eppendorf AG, Basilea, la Svizzera).

Per la sintesi del cDNA, 1 µg di RNA totale è stato retro- trascritto con l' High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA) utilizzando come primer esameri random.

Per la PCR sono stati utilizzati primers specifici per ogni Acquaporina esaminata:

#### *AQP<sub>1</sub>*

Per l'AQP<sub>1</sub> di bufalo, i primers, sono stati assegnati su sequenze pubblicate nella GenBank® (Bos taurus aquaporin 1 Genbank accession number NM\_174702) con il software Primer Express™ PE Applied Biosystems, USA).

I primer utilizzati sono stati rispettivamente 5'-GTGGCCCTGGGACATCTG-3' e 5'- CGTCGGCATCCAGGTCATAC-3' con amplicone a 250-bp. I cicli di PCR sono stati: 94 °C (30 s), 60 °C (30 s), 72 °C (1 minuto) per 35 cicli; 72 °C (5 min).

I prodotti di PCR sono stati separati su gel di agarosio 1,5% e visualizzati mediante luce UV. Infine i prodotti della PCR sono stati purificati con il Kit GFX PCR DNA and Gel Purification (code 28-9034-70, GE Healthcare, USA ) e sequenziati.

*AQP<sub>4</sub>*

Per l'AQP<sub>4</sub> di bufalo, i primers, sono stati assegnati su sequenze pubblicate nella GenBank® (Bos taurus aquaporin 1 Genbank accession number NM\_181003) con il software Primer Express™ PE Applied Biosystems, USA).

I primer utilizzati sono stati rispettivamente 5'-GGAGGATTAGCATCGCCAAGT-3' and 5'-AAAGCTATGGAACCGGTGACA-3' con amplicone a 250-bp.

I cicli di PCR sono stati: 94 °C (30 s), 60 °C (30 s), 72 °C (1 minuto) per 35 cicli; 72 °C (5 min). I prodotti di PCR sono stati separati su gel di agarosio 1,5% e visualizzati mediante luce UV. Infine i prodotti della PCR sono stati purificati con il Kit GFX PCR DNA and Gel Purification (code 28-9034-70, GE Healthcare, USA) e sequenziati.

*AQP<sub>5</sub>*

Per l'AQP<sub>5</sub> di bufalo, i primers, sono stati assegnati su sequenze pubblicate nella GenBank® (Bos taurus aquaporin 5 Genbank accession number (NM\_001191160) con il software Primer Express™ PE Applied Biosystems, USA).

I primer utilizzati sono stati rispettivamente 5'-ATTGGCCTGTCCGTCACACT-3' and 5'-CCTCGTCCGGCTCATACGT-3' con amplicone a 250-bp.

I cicli di PCR sono stati: 94 °C (30 s), 60 °C (30 s), 72 °C (1 minuto) per 35 cicli; 72 °C (5 min). I prodotti di PCR sono stati separati su gel di agarosio 1,5% e visualizzati mediante luce UV. Infine i prodotti della PCR sono stati purificati con il Kit GFX PCR DNA and Gel Purification (code 28-9034-70, GE Healthcare, USA) e sequenziati.



## ***Risultati***

### *AQP<sub>1</sub>*

#### *Immunoistochimica*

L'immunoreattività osservata per l'Acquaporina 1 (AQP<sub>1</sub>- IR) nel piccolo e grosso intestino è riepilogata nella TAVOLA 2 e TAVOLA 3 (Fig. 5a e Fig. 6a) e nelle Tabelle 4 e 5.

Il gruppo di soggetti che non aveva mai assunto alcun tipo di alimento (To) ha mostrato, fatta eccezione che per il duodeno, (AQP<sub>1</sub>- IR) in tutti i tessuti esaminati, nell'endotelio dei vasi sia del piccolo sia del grosso intestino (Fig. 5a e Fig. 6a).

La densità di AQP<sub>1</sub>- IR del grosso intestino si è rivelata maggiore rispetto al piccolo (Tabella 4 e 5).

Il gruppo alimentato con colostro (T<sub>1</sub>) ha mostrato, a differenza del primo, immunoreattività in tutti i tessuti esaminati (Fig. 5b, e, h; Fig. 6b, e) e con maggiore intensità (Tabella 4 e 5).

Il digiuno si è rivelato essere quello con maggiore intensità. Altro dato interessante emerso è stato il riscontro di immunoreattività vs AQP<sub>1</sub>-IR a livello dei gangli del sistema nervoso enterico, nelle cellule linfoidi (GALT) e negli enterociti sia del piccolo che del grosso intestino (Fig.5b e Fig 6b).

Il gruppo di soggetti alimentati esclusivamente con latte (T<sub>2</sub>) ha mostrato AQP<sub>1</sub>-IR nell'endotelio dei vasi tutto il tratto gastrointestinale (Fig. 5c e Fig. 6c) e, raramente, nei neuroni enterici del grosso intestino.

Nel gruppo degli adulti (T<sub>3</sub>) AQP<sub>1</sub>-IR si è distribuita nell'endotelio, negli enterociti, nel tessuto linfoide e a livello dei neuroni enterici nei differenti tratti sia del piccolo che del grosso intestino (Fig. 5 d, Fig. 6d, Tabella. 4 e Tabella. 5).

## TAVOLA 2

*DISTRIBUZIONE DELL'IMMUNOREATTIVITA' DELL' AQP<sub>1</sub> NEL  
PICCOLO INTESTINO*

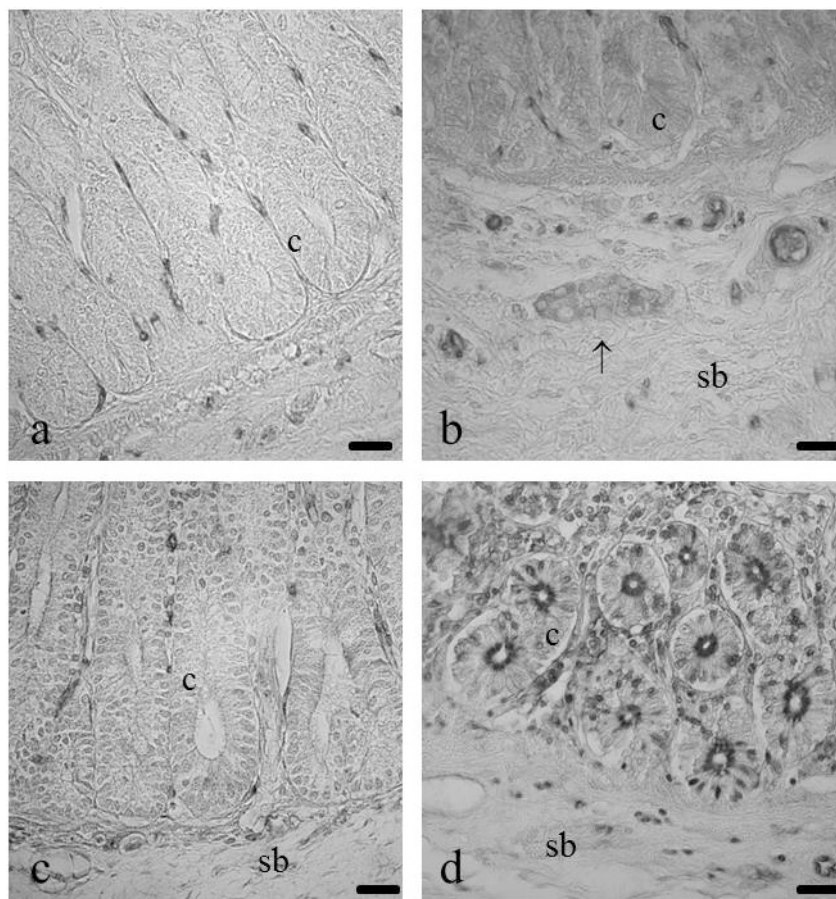


Figura 5: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 1 nel digiuno di bufalo al T0 (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) C cripte; sb sottomucosa; ↑ ganglio sottomucoso; barra 25 micron

Tabella 4: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 1

	<i>duodeno</i>				<i>digiuno</i>				<i>ileo</i>			
	<i>To</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>To</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>To</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>
<b>Endotelio</b>	-	++	++	++	+	+++	++	+++	+	++	++	++
<b>Enterociti</b>	-	-	-	++	-	+	-	+++	-	+	-	++
<b>Neuroni enterici</b>	-	-	-	-	-	++	-	-/+	-	-/+	-	+
<b>Tessuto linfoide</b>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Cellule endocrine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-non rilevabile; -/+ rare; + bassa densità; ++ media densità; +++ alta densità

## TAVOLA 3

*DISTRIBUZIONE DELL'IMMUNOREATTIVITA' DELL'AQP1 NEL GROSSO  
INTESTINO*

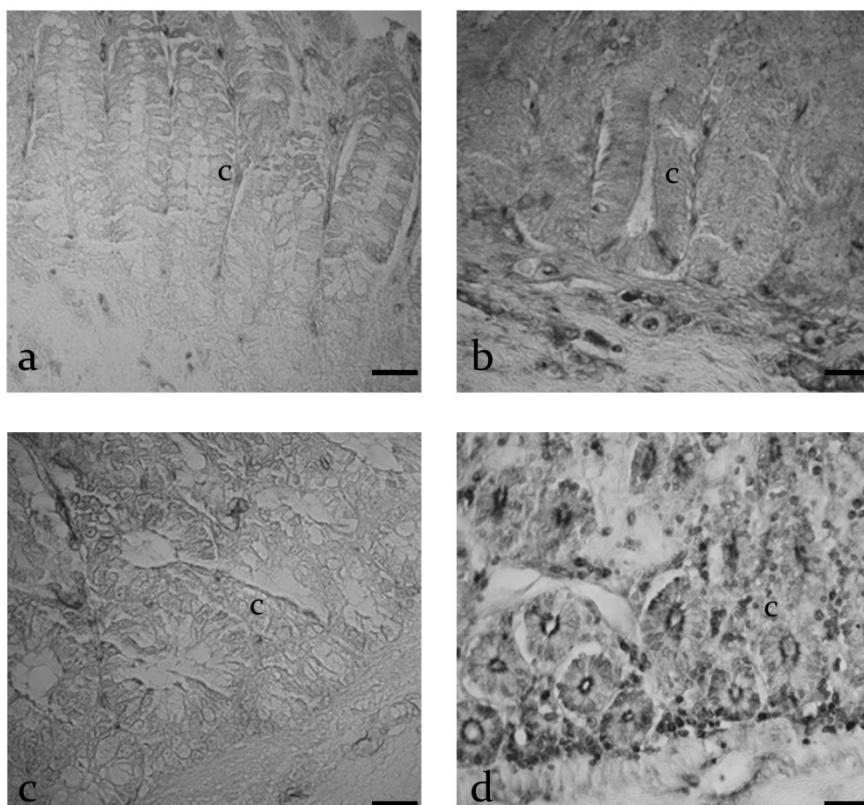


Figura 6: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 1 nel colon di bufalo al T0 (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) C cripte; sb sottomucosa; barra 25 micron

Tabella 5: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 1

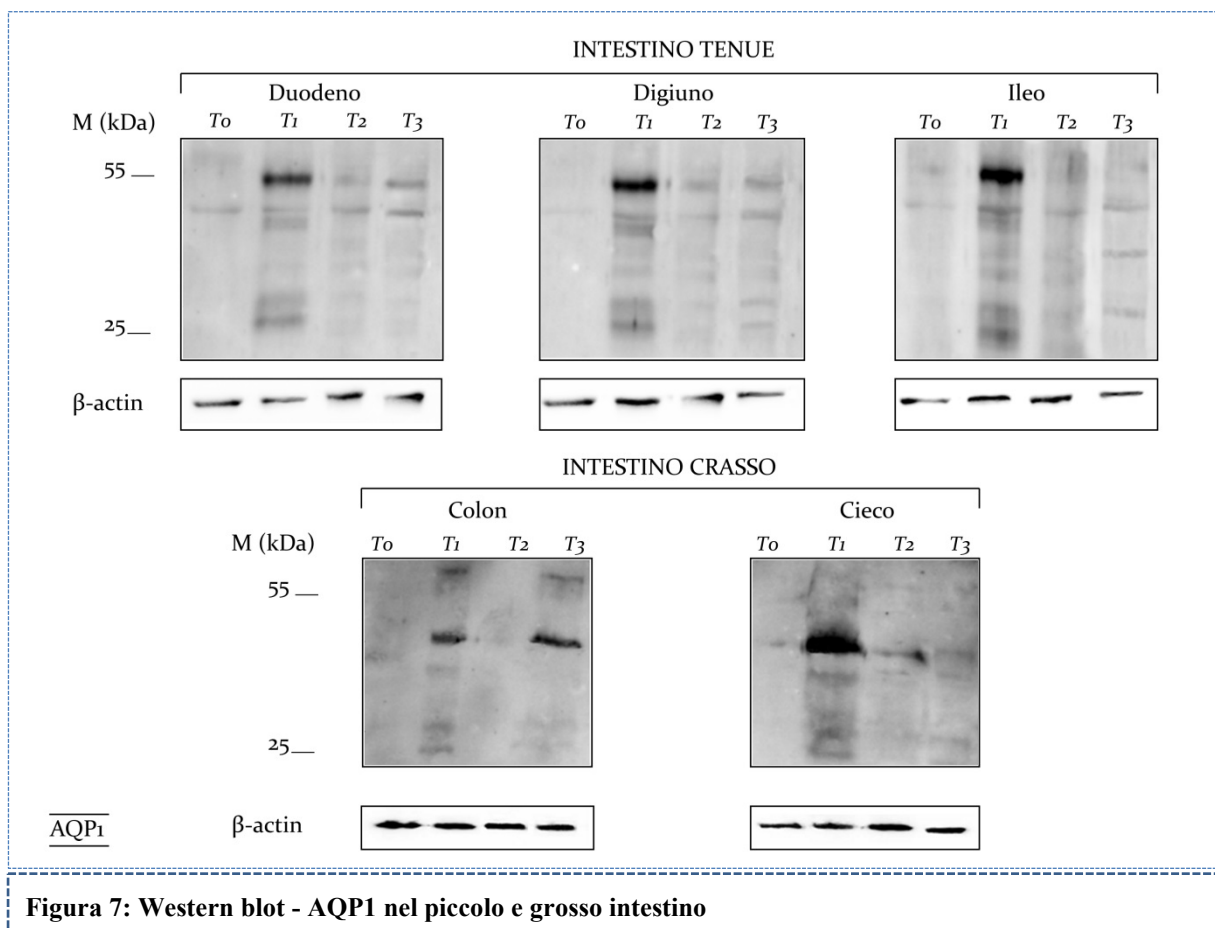
	<i>cieco</i>				<i>colon</i>			
	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>
<b>Endotelio</b>	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Enterociti</b>	-	-	-	+++	-	++	-	+++
<b>Neuroni enterici</b>	-	+	-/+	+	-	+	-/+	+
<b>Tessuto linfoide</b>	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Cellule endocrine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

-non rilevabile; -/+ rare; + bassa densità; ++ media densità; +++ alta densità

### Western blotting

Lo studio dell'espressione dell'AQP1 nei quattro gruppi presi in considerazione è stato effettuato utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la parte C-terminale dell'AQP1.

L'analisi ha rivelato un profilo proteico specifico per l'AQP1 (Fig. 7) con una banda a 28 kDa che corrisponde alla relativa massa molecolare e ad altre bande ad un più elevato peso molecolare.



Per quanto riguarda il gruppo che non ha mai assunto alimento (TO), i nostri esperimenti indicano che l'AQP<sub>1</sub> è presente soltanto come una banda debole che corrisponde a un peso molecolare di circa 45 kDa sia nel piccolo che nel grande intestino.

Nel gruppo che aveva assunto colostro (T<sub>1</sub>) in tutti i tessuti esaminati l'AQP<sub>1</sub> si è rivelata espressa sia ad un peso molecolare di 28 kDa sia come bande multiple, rispettivamente a 45 e 60 kDa che corrispondono a isoforme a maggior peso molecolare del previsto.

Un simile profilo è stato osservato nel gruppo che aveva assunto solo latte (T<sub>2</sub>) con la differenza che in quest'ultimo si è verificata una minore intensità di banda.

Per quanto riguarda il gruppo dei soggetti adulti (T<sub>3</sub>), AQP<sub>1</sub> si è rivelata espressa in tutti i tratti esaminati.

Le bande evidenziate avevano un peso molecolare di 28 kDa, di intensità inferiore alle bande multiple riscontrate ad un peso molecolare di 45 e 60 kDa.

L'intensità di banda rilevata nel gruppo degli adulti (T<sub>3</sub>) ha mostrato un andamento intermedio tra il gruppo che aveva assunto colostro e quello che viceversa aveva assunto solo latte.

### *Analisi densitometrica*

La differenza densitometrica tra i soggetti che avevano assunto colostro e quelli che avevano assunto solo latte è stata confermata dall'analisi densitometrica (Fig. 8) infatti la banda a 28kDa ha rivelato una differenza statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) (colostro vs latte) in tutti i tratti intestinali. L'incremento dell'intensità di banda è stato rispettivamente di 2,6 per il duodeno, 3 per il digiuno, 3,5 per l'ileo, 2,6 per il colon e 2,12 per l'intestino cieco.

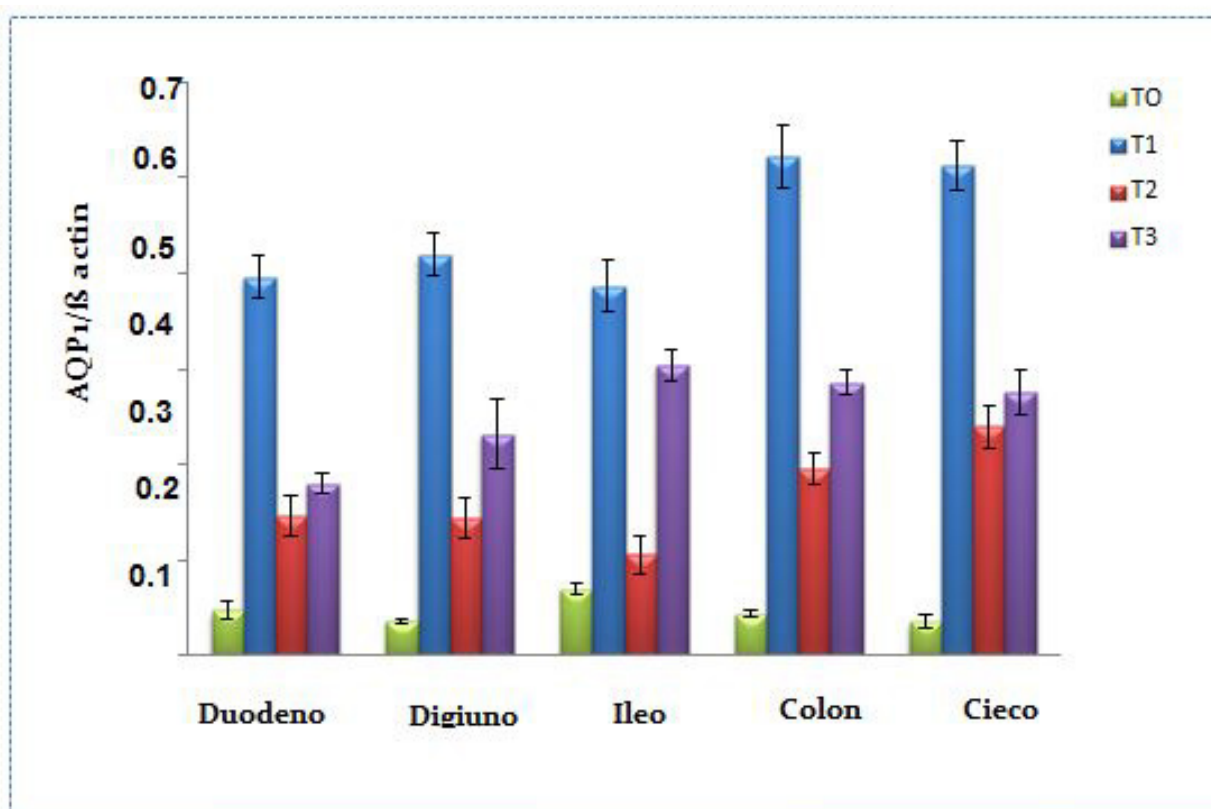
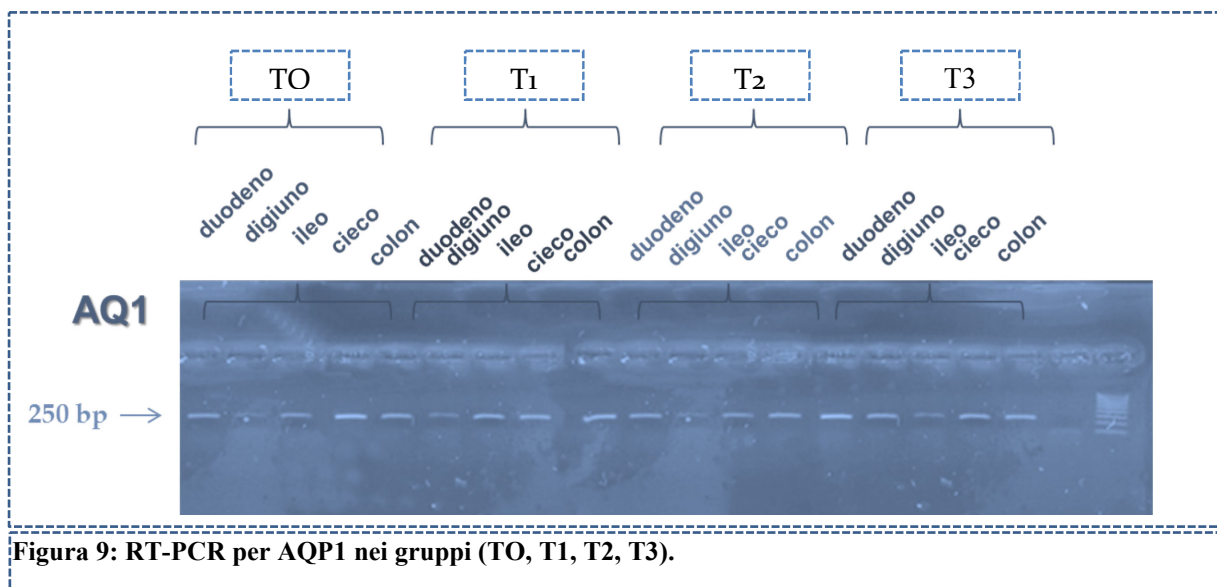


Figura 8: Grafico dell'analisi densitometrica dell'AQP1

### RT-PCR

L'analisi di RT-PCR ha mostrato l'espressione dell'mRNA dell' AQP1 sia nel piccolo che nel grande intestino ed in tutti i gruppi presi in considerazione (Fig. 9).

La reazione ha rivelato una singola banda (250bp) in tutti i tratti intestinali esaminati. Per verificare l'efficienza della trascrizione inversa e per escludere la contaminazione del DNA, un frammento del cDNA di  $\beta$ -actina (GenBank accession no. NC\_007326) è stato amplificato e sequenziato con primer disegnato per l'introne della  $\beta$ -actina per 5'-CAG CTC CTC CCT GGA GAA GA-3'.  $\beta$ -actin rev 5'-CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG-3'.





## AQP<sub>4</sub>

### *Immunistoichimica*

L'immunoreattività osservata per l'Acquaporina 4 (AQP<sub>4</sub>- IR) nel piccolo e grosso intestino è riepilogata nella TAVOLA 4 e TAVOLA 5.

Per quanto riguarda il gruppo di soggetti che non aveva mai assunto alcun tipo di alimento (T<sub>0</sub>), a differenza di quanto evidenziato per l'AQP<sub>1</sub>, non è stato possibile riscontrare immunoreattività in nessuno dei tratti esaminati (Fig. 10a e Fig. 11a).

Il gruppo alimentato con colostro (T<sub>1</sub>) ha mostrato, a differenza del primo, immunoreattività in tutti i tessuti esaminati (Fig. 10b e Fig. 11b,) (Tabella 6 e 7); il digiuno si è rivelato essere quello con intensità più evidente.

Altro dato interessante emerso è stato il riscontro di AQP<sub>4</sub>-IR negli enterociti, nei neuroni enterici e nel tessuto linfoide del piccolo e grosso intestino (Fig. 10b e Fig. 11 b) e nell'endotelio del grosso intestino (Fig. 11b e Tabella 6 e 7).

Il gruppo di soggetti alimentati esclusivamente con latte (T<sub>2</sub>) ha mostrato AQP<sub>4</sub>-IR nell'endotelio dei vasi tutto il tratto gastrointestinale (Fig.10c e Fig 11c), negli enterociti e nei neuroni enterici (Tabella 6 e 7).

Nel gruppo degli adulti (T<sub>3</sub>) AQP<sub>4</sub>-IR si è distribuita enterociti, tessuto linfoide e neuroni enterici dei differenti tratti del piccolo e grosso intestino (Fig. 10 d, Fig. 11d, Tabella 6 e 7).



## TAVOLA 4

*DISTRIBUZIONE DELL'IMMUNOREATTIVITA' DELL'AQP<sub>4</sub> NEL  
PICCOLO INTESTINO*

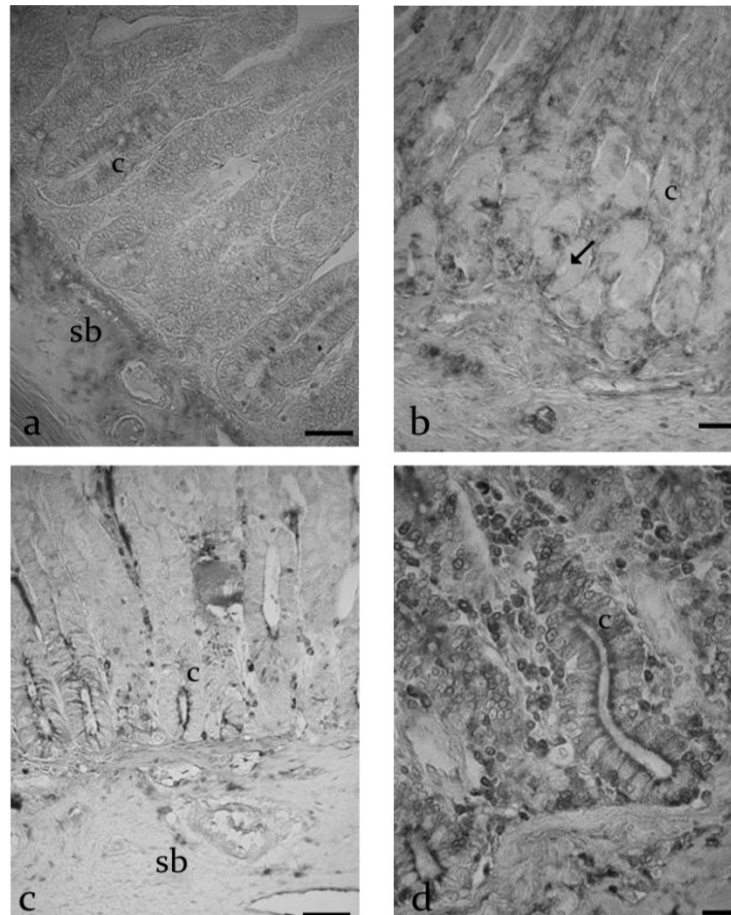


Figura 10: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 4 nel duodeno di bufalo al T0 (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) C cripte; sb sottomucosa; barra 25 micron

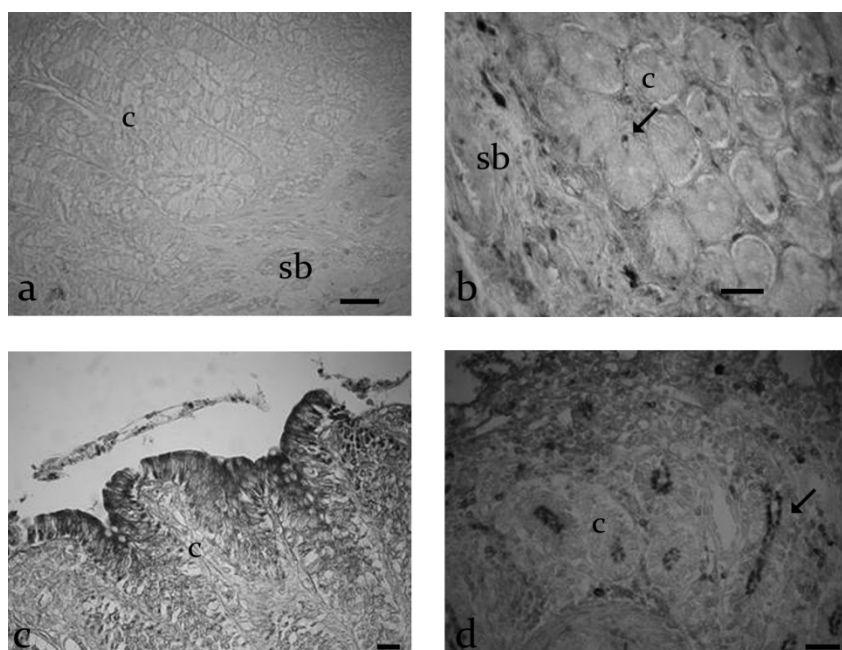
Tabella 6: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 4

	<i>duodeno</i>				<i>digiuno</i>				<i>Ileo</i>			
	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>
<b>Endotelio</b>	-	-	+	+	-	-	-	++	-	-	+	++
<b>Enterociti</b>	-	+	++	++	-	+	-	++	-	-	-	++
<b>Neuroni enterici</b>	-	-	-	-	-	++	-	-/+	-	-/+	-	+
<b>Tessuto linfoide</b>	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Cellule endocrine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-non rilevabile; -/+ rare; + bassa densità; ++ media densità; +++ alta densità

## TAVOLA 5

*DISTRIBUZIONE DELL'IMMUNOREATTIVITA' DELL' AQP<sub>4</sub> NEL  
GROSSO INTESTINO*



**Figura 11:** Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 4 nel colon di bufalo al T0 (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d)

**Tabella 7:** Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 4

	<i>cieco</i>				<i>colon</i>			
	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>
<b>Endotelio</b>	-	+	++	++	-	-	+	++
<b>Enterociti</b>	-	-/+	-	++	-	-/+	++	+++
<b>Neuroni enterici</b>	-	+	-/+	+	-	+	-/+	+
<b>Tessuto linfoide</b>	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Cellule endocrine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
non rilevabile; -/+ rare; + bassa densità; ++ media densità; +++ alta densità								

### *Western blot*

Lo studio dell'espressione dell'AQP<sub>4</sub> nei quattro gruppi presi in considerazione è stato effettuato utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la parte C-terminale dell'AQP<sub>4</sub>.

L'analisi ha rivelato un profilo proteico specifico per l'AQP<sub>4</sub> (Fig. 12) con una banda a 35 kDa che corrisponde alla relativa massa molecolare e ad altre bande ad un più elevato peso molecolare.

Per quanto riguarda il gruppo che non aveva mai assunto alimento (T<sub>0</sub>), i nostri esperimenti indicano che l'AQP<sub>4</sub> è presente soltanto come una banda debole che corrisponde a un peso molecolare di circa 35 kDa sia nel piccolo che nel grosso intestino. E' stato inoltre possibile evidenziare, in ogni tratto esaminato, delle bande a 55 kDa corrispondenti ad isoforme con maggiore peso molecolare e con una intensità maggiore rispetto a quelle di 35 kDa.

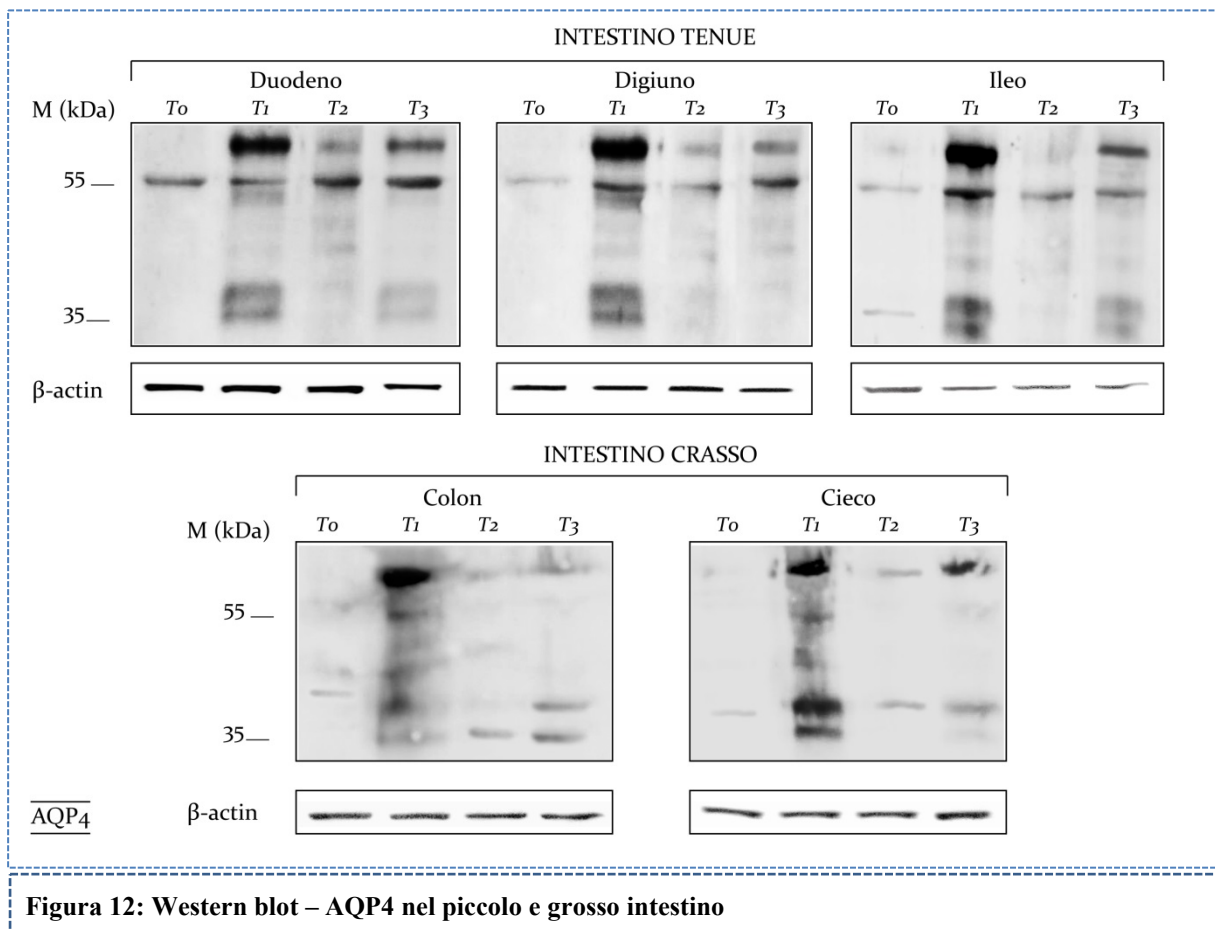
Nel gruppo che aveva assunto colostro (T<sub>1</sub>), in tutti i tessuti esaminati, l'AQP<sub>4</sub> si è rivelata espressa sia ad un peso molecolare di 35 kDa sia come bande multiple, rispettivamente a 55 e 60 kDa che corrispondono a isoforme a maggior peso molecolare del previsto.

Nel gruppo di soggetti alimentati con latte (T<sub>2</sub>) le bande osservate hanno mostrato un profilo simile a quello di T<sub>1</sub> ma con una intensità intermedia tra il gruppo dei soggetti adulti e quello che aveva assunto colostro.

Per quanto riguarda il gruppo dei soggetti adulti (T<sub>3</sub>), AQP<sub>4</sub> si è rivelata espressa in tutti i tratti esaminati.

Le bande evidenziate avevano un peso molecolare di 35 kDa, di intensità inferiore alle bande multiple riscontrate ad un peso molecolare di 55 e 60 kDa.

L'intensità di banda rilevata nel gruppo degli adulti ( $T_3$ ) ha mostrato un andamento simile al  $T_1$  e  $T_2$  ma anche esso con intensità inferiore al gruppo che aveva assunto colostro.



### Analisi densitometrica

Anche per l'AQP4 la differenza tra i soggetti che avevano assunto colostro e quelli che avevano assunto solo latte è stata confermata dall'analisi densitometrica (Fig. 13) infatti la banda a 35 kDa ha rivelato una differenza statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) (colostro vs latte) in tutti i tratti intestinali. L'incremento dell'intensità di banda è stato rispettivamente di 3,4 per il duodeno, 3,1 per il digiuno, 3,4 per l'ileo, 2,8 per il colon e 2,4 per l'intestino cieco.

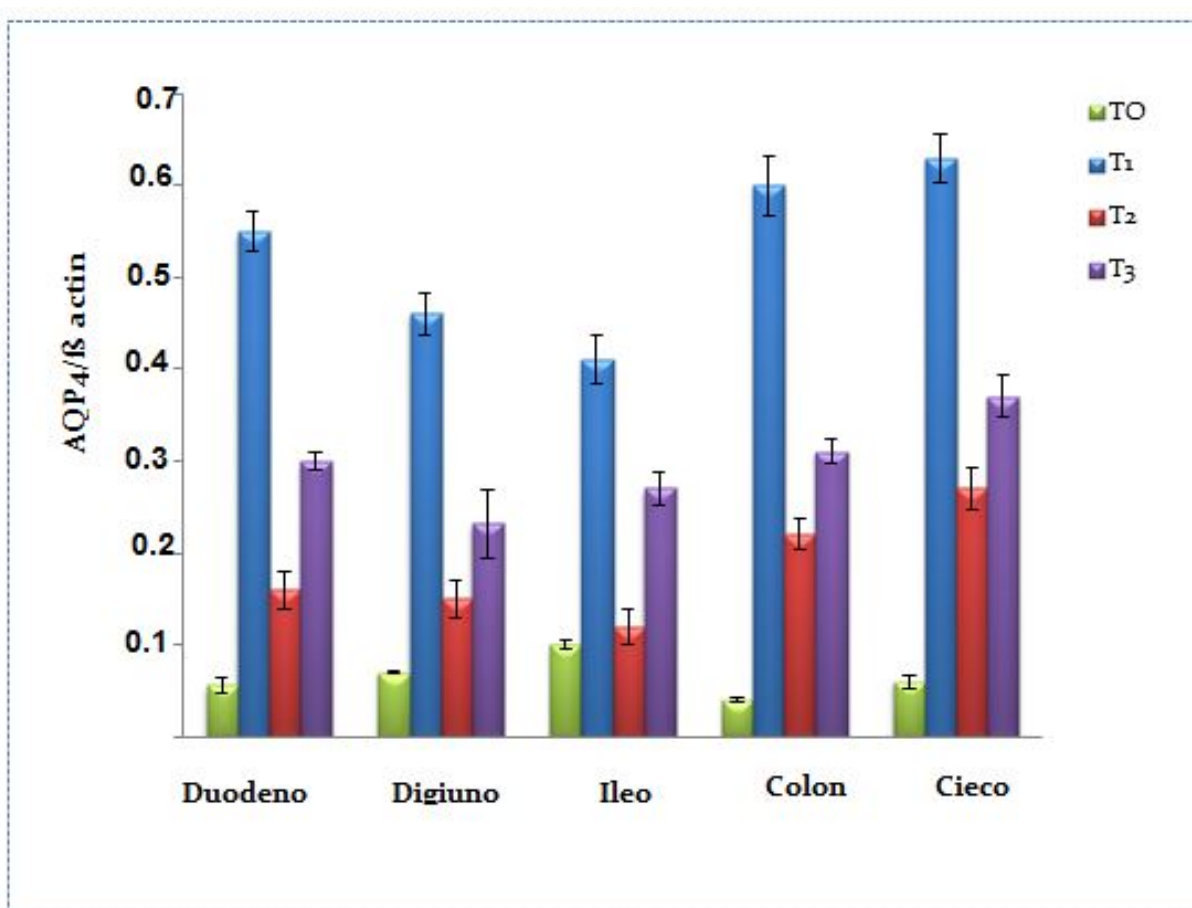
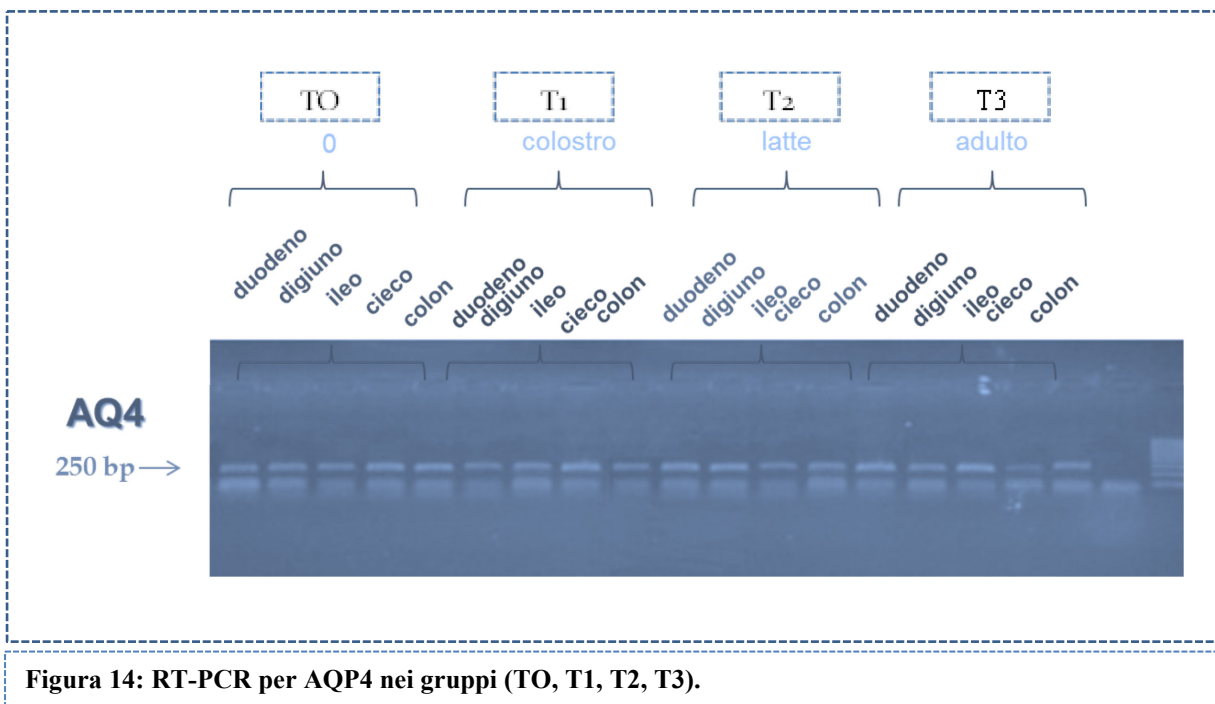


Figura 13: Grafico dell'analisi densitometrica dell' AQP4 nei vari tratti intestinali

### RT-PCR

L'analisi di RT-PCR ha mostrato l'espressione dell'mRNA dell' AQP<sub>4</sub> sia nel piccolo che nel grande intestino ed in tutti i gruppi presi in considerazione (Fig. 14).

La reazione ha rivelato una singola banda (250bp) in tutti i tratti intestinali esaminati. Per verificare l'efficienza della trascrizione inversa e per escludere la contaminazione del DNA, un frammento del cDNA di  $\beta$ -actina (GenBank accession no. NC\_007326) è stato amplificato e sequenziato con primer disegnato per l'introne della  $\beta$ -actina per 5'-CAG CTC CTC CCT GGA GAA GA-3'.  $\beta$ -actin rev 5'-CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG-3'.



## AQP<sub>5</sub>

### *Immunoistochimica*

L'immunoreattività osservata per l'Acquaporina 5 (AQP<sub>5</sub>- IR) nel piccolo e grosso intestino è riepilogata nella TAVOLA 6 E TAVOLA 7.

Il gruppo di soggetti che non aveva mai assunto alcun tipo di alimento (To) ha mostrato AQP<sub>5</sub>- IR nelle cellule endocrine di tutti i tratti del piccolo e grosso intestino (Fig. 15 a, Fig. 16 a, Tabella 8 e 9) e nell'endotelio dei vasi del grosso intestino (Fig.16a; Tabella 8 e 9).

Al T<sub>1</sub>, l'AQP<sub>5</sub>-IR si distribuisce nelle cellule endocrine, nel tessuto linfoide e neuroni enterici del piccolo e grosso intestino (Fig. 15b e Fig. 16b; Tabella 8 e 9).

Nel grosso intestino, inoltre, l'AQP<sub>5</sub>-IR si localizza nell'endotelio dei vasi e raramente negli enterociti (Fig. 16b; Tabella 9).

Al T<sub>2</sub>, AQP<sub>5</sub>-IR si localizza nell'endotelio dei vasi e nelle cellule endocrine di tutto il tratto gastrointestinale (Fig.15c e Fig 16c) e raramente negli enterociti e nei neuroni enterici (Tabella 8 e 9).

Al T<sub>3</sub>, AQP<sub>5</sub>-IR si distribuisce nelle cellule endocrine , nell'endotelio, enterociti, tessuto linfoide e neuroni enterici dei differenti tratti del piccolo e grosso intestino (Fig. 15 d, Fig. 16d, Tabella 8 e 9).



## TAVOLA 6

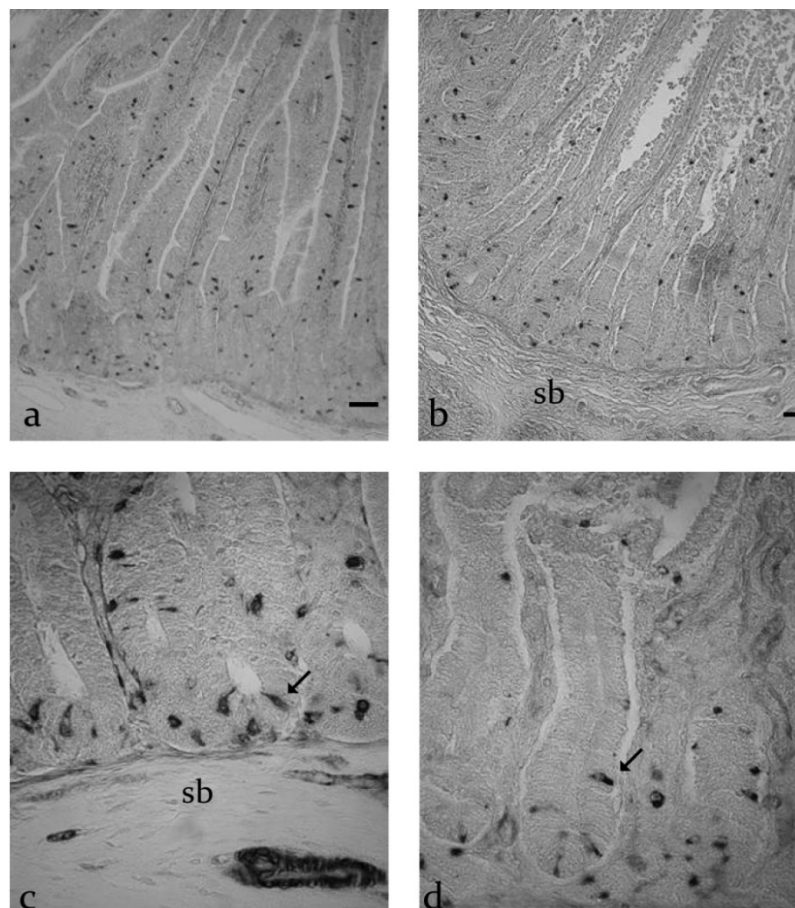
DISTRIBUZIONE DELL'IMMUNOREATTIVITA' DELL' AQP<sub>5</sub> NEL  
PICCOLO INTESTINO

Figura 15: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 5 nel duodeno di bufalo al T0 (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) C cripte; sb sottomucosa; barra 25 micron

Tabella 8: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 5

	<i>duodeno</i>				<i>digiuno</i>				<i>ileo</i>			
	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>	<i>T<sub>0</sub></i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2</sub></i>	<i>T<sub>3</sub></i>
<b>Endotelio</b>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
<b>Enterociti</b>	-	-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-
<b>Neuroni enterici</b>	-	-	-	-	-	++	-	-/+	-	-/+	-	+
<b>Tessuto linfoide</b>	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Cellule endocrine</b>	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	++

-non rilevabile; +/- rare; + bassa densità; ++ media densità; +++ alta densità



## TAVOLA 7

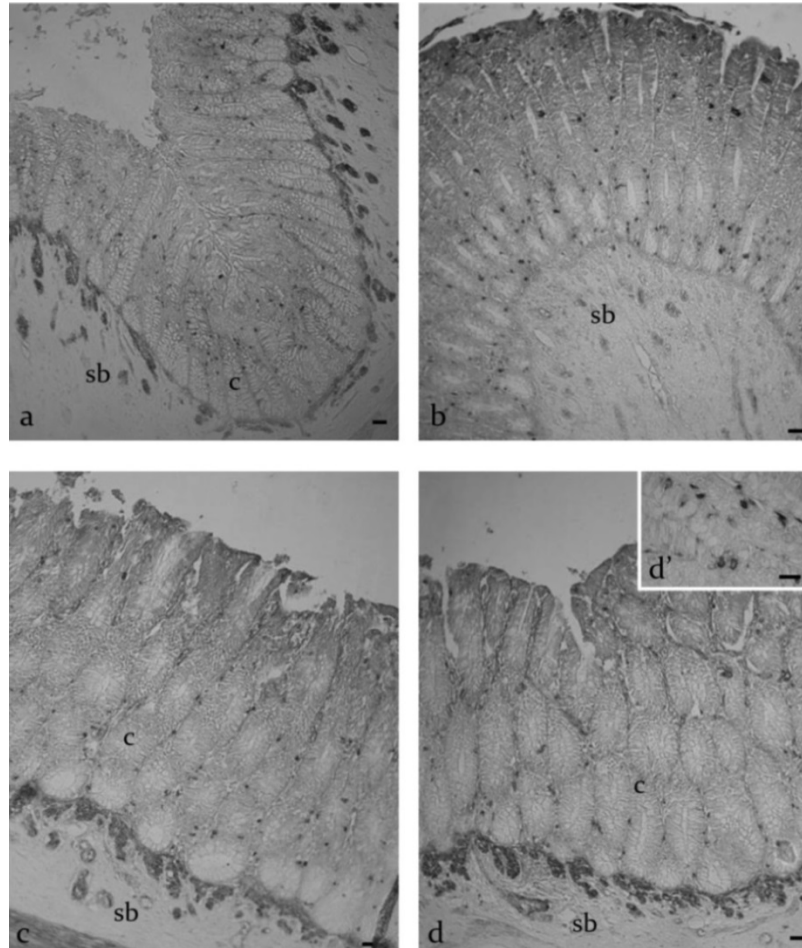
DISTRIBUZIONE DELL'IMMUNOREATTIVITA' DELL' AQP<sub>5</sub> NEL GROSSO INTESTINO

Figura 16: Fig. 6 Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 5 nel colon di bufalo al T0 (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) sb sottomucosa; barra 25 micron

Tabella 9: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 5

	<i>cieco</i>				<i>colon</i>			
	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>To</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>
<b>Endotelio</b>	+	+	++	++	+	+	+	++
<b>Enterociti</b>	-	-/+	-	+	-	-/+	+	+
<b>Neuroni enterici</b>	-	+	-/+	+	-	+	-/+	+
<b>Tessuto linfoide</b>	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Cellule endocrine</b>	+	+	+	+	+	+	+	+

-non rilevabile; -/+ rare; + bassa densità; ++ media densità; +++ alta densità

*Western blot*

Lo studio dell'espressione dell'AQP5 nei quattro gruppi presi in considerazione è stato effettuato utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la parte C-terminale dell'AQP5.

L'analisi ha rivelato un profilo proteico per l'AQP5 (Fig. 17) con una banda a 35 kDa che corrisponde alla relativa massa molecolare e ad altre bande ad un più elevato peso molecolare.

Per quanto riguarda il gruppo T<sub>0</sub>, i nostri esperimenti hanno mostrato la presenza dell'AQP5 come una banda debole corrispondente a un peso molecolare di circa 35 kDa sia nel piccolo che nel grosso intestino.

E' stato inoltre possibile evidenziare, in ogni tratto esaminato, delle bande a 55 e 60 kDa corrispondenti ad isoforme con maggiore peso molecolare e con una intensità maggiore rispetto a quelle di 35 kDa.

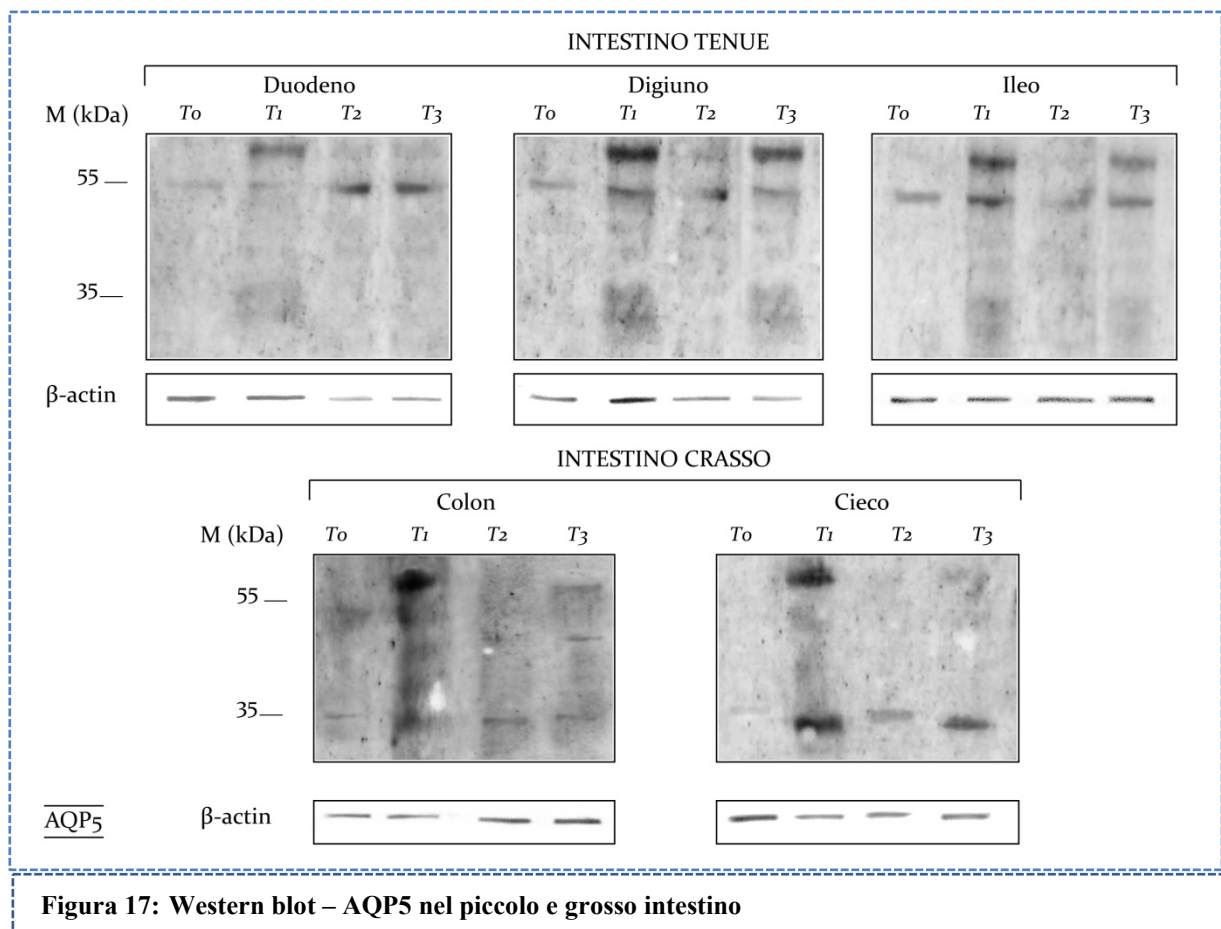
Nel gruppo T<sub>2</sub>, che aveva assunto colostro l'AQP5 si è rivelata espressa sia ad un peso molecolare di 35 kDa sia come bande multiple, rispettivamente a 55 e 60 kDa in tutti i tratti esaminati e con un intensità visivamente superiore a quella riscontrata per gli altri gruppi.

Nel gruppo di soggetti alimentati con latte (T<sub>2</sub>) le bande osservate hanno mostrato un profilo simile a quello di T<sub>1</sub> ma con una intensità intermedia tra il gruppo dei soggetti adulti e quello che aveva assunto colostro.

Per quanto riguarda il gruppo dei soggetti adulti, AQP4 si è rivelata espressa in tutti i tratti esaminati.

Le bande evidenziate avevano un peso molecolare di 35 kDa, di intensità inferiore alle bande multiple riscontrate ad un peso molecolare di 55 e 60 kDa.

L'intensità di banda rilevata nel gruppo degli adulti ( $T_3$ ) ha mostrato un andamento simile al  $T_1$  e  $T_2$  ma anche esso con intensità inferiore al gruppo che aveva assunto colostro.



### Analisi densitometrica

Così come rilevato per l'AQP1 e AQP4 anche nell'analisi densitometrica rilevata per l'AQP5 è stato possibile osservare una differenza sostanziale tra i soggetti che avevano assunto colostro e quelli che avevano assunto solo latte (Fig. 18).

La banda a 35 kDa ha rivelato anche per questa acquaporina una differenza statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) (colostro vs latte) in tutti i tratti intestinali. L'incremento dell'intensità di banda è stato rispettivamente di 2,5 per il duodeno, 1,9 per il digiuno, 2,6 per l'ileo, 2,4 per il colon e 2 per l'intestino cieco.

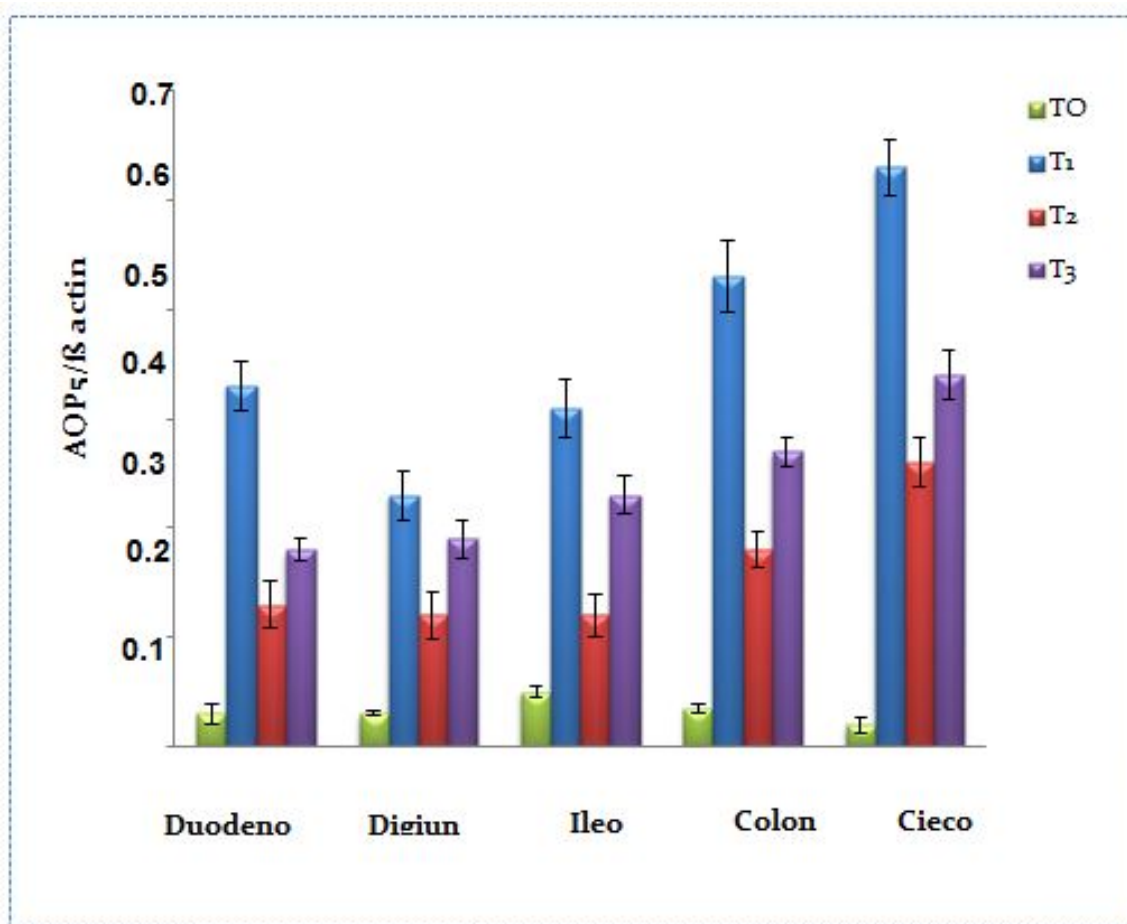


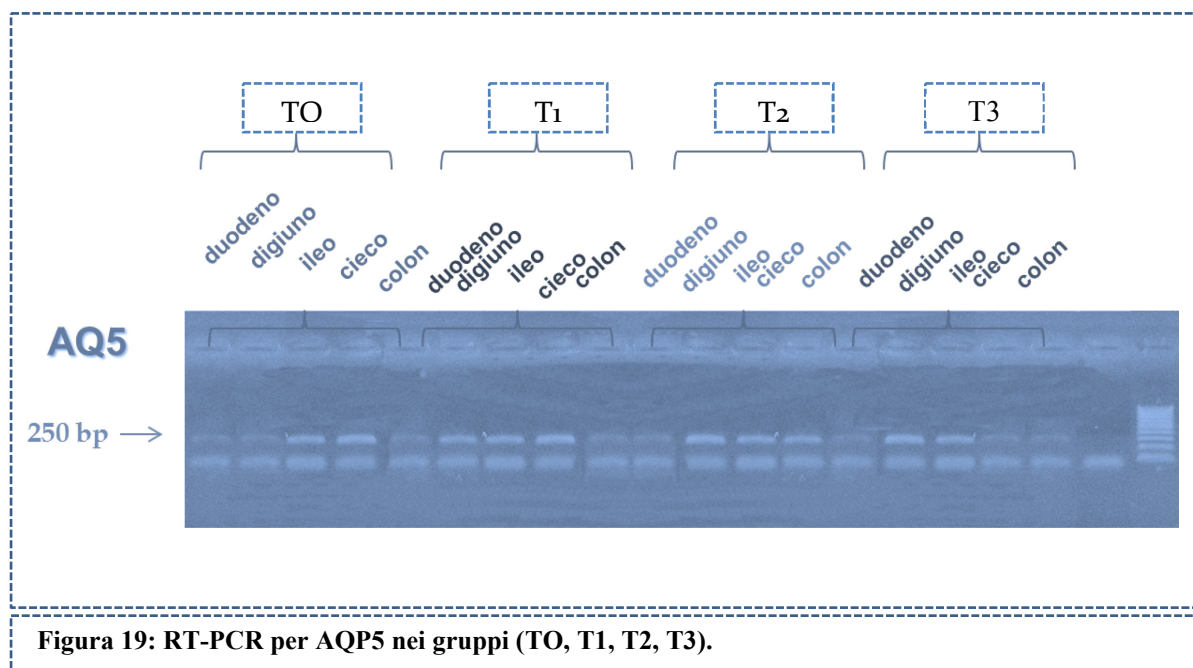
Figura 18: Grafico dell'analisi densitometrica dell' AQP5 nei vari tratti intestinali

### RT-PCR

L'analisi di RT-PCR ha mostrato l'espressione anche per l'acquaporina 5 dell'mRNA sia nel piccolo che nel grande intestino ed in tutti i gruppi presi in considerazione (Fig. 19).

La reazione ha rivelato una singola banda (250bp) in tutti i tratti intestinali esaminati.

Un frammento del cDNA di  $\beta$ -actina (GenBank accession no. NC\_007326) è stato amplificato e sequenziato con primer disegnato per l'introne della  $\beta$ -actina per 5'-CAG CTC CTC CCT GGA GAA GA-3'.  $\beta$ -actin rev 5'-CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG-3' per verificare l'efficienza della trascrizione inversa e per escludere la contaminazione del DNA.



## DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'espressione, la distribuzione e la localizzazione cellulare dell'AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub> nei vari tratti intestinali dei vitelli bufalini durante i primi giorni di vita, cercando di chiarirne il possibile ruolo durante l'assunzione di colostro.

L'intestino tenue e l'intestino crasso partecipano in maniera diversa ai meccanismi di assorbimento e di secrezione regolando l'assorbimento dell'acqua e di numerosi soluti.

Negli ultimi anni, la scoperta delle acquaporine (AQPs) nel sistema digerente dei mammiferi ha suscitato notevole interesse soprattutto per quanto concerne la loro partecipazione negli scambi cellulari d'acqua nei vari tratti del sistema digerente.

I risultati emersi dalla nostra ricerca hanno rivelato, per la prima volta, la presenza dell'AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub> in tutti i tratti intestinali del vitello bufalino, dati confermati dal riscontro dell'mRNA per questa proteina.

Tale espressione è risultata essere maggiore nei soggetti che avevano assunto colostro. Inoltre, le AQPs oggetto di ricerca presentavano un diverso pattern di distribuzione e localizzazione cellulare.

Prendendo in esame l'AQP<sub>1</sub>, l'AQP<sub>4</sub> e l'AQP<sub>5</sub>, in base ai risultati ottenuti, è possibile delineare alcune ipotesi sul loro ruolo in relazione anche a precedenti lavori condotti sul tratto intestinale nelle diverse specie.

È ben noto che l'AQP<sub>1</sub> gioca un ruolo fondamentale in molti distretti dell'organismo, ad esempio il rene (tubuli contorti prossimali, ansa di Henle e vasa recta) [127] o l'endotelio dei capillari sanguigni [94].

Recentemente la scoperta dell'espressione di alcune AQPs nell'apparato gastrointestinale del ratto, ha suggerito un loro possibile ruolo anche

nell'assorbimento dei grassi e in altre attività ancora non completamente chiarite.

La particolare localizzazione immunoistochimica osservata per l'AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub> nell'endotelio dei capillari sanguigni e linfatici è risultata in pieno accordo con le osservazioni effettuate da Koyama [128], sempre su esemplari di ratto, dove veniva descritta la partecipazione dell' AQP<sub>1</sub> negli scambi d'acqua nei fluidi interstiziali e nel sistema linfatico.

Dati analoghi sono stati segnalati anche da Nielsen, che è riuscito a dimostrare la presenza dell'AQP<sub>1</sub> nell'endotelio capillare, piuttosto che nel parenchima tissutale [94].

Secondo l'autore, l'assorbimento intestinale di acqua si verifica attraverso meccanismi di diffusione cellulare o paracellulare influenzati dall'incremento della pressione oncotica nel lume dei vasi sanguigni e linfatici.

La presenza dell'AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub>, legata probabilmente all'assorbimento dei fluidi nell'apparato digerente, osservata negli enterociti, risulta in pieno accordo con studi effettuati sull'espressione dell' AQP<sub>4</sub> nel tratto gastrointestinale del ratto [128].

A conferma di quanto espresso precedentemente, lavori di Naftalin hanno ipotizzato che i soluti siano trasportati attivamente dal lume della cripta attraverso una barriera semipermeabile generando così uno spazio interstiziale ipertonico [129] [130].

Il riscontro dell'AQP<sub>1</sub> nel GALT (tessuto linfoide associato all'intestino) dei soggetti che avevano assunto colostro e negli animali adulti risulta inoltre in pieno accordo con studi effettuati su linfociti umani, dove è stata avanzata l'ipotesi di utilizzare l' espressione dell' AQPs a livello linfocitario come marker di attivazione e proliferazione linfocitaria [131].

Anche i dati emersi dai nostri risultati suggeriscono una possibile partecipazione di queste cellule linfoide all'immunità intestinale.

Altro dato interessante emerso dalla sperimentazione è l'elevata immunoreattività nei confronti dell'AQP5 a livello delle ghiandole endocrine.

Il nostro dato trova pieno riscontro con gli studi effettuati da Matsuzaki nel 2003 sul ratto [104]. La particolare localizzazione riscontrata in questa specie potrebbe suggerire che, anche nella specie bufalina, l'AQP5 interviene nella secrezione dei fluidi in questi distretti.

L'analisi western blot ha rivelato la presenza dell'AQP1, AQP4 e AQP5 in tutti i tratti dell'intestino e in tutti i gruppi degli animali, anche se con densità di banda di differente intensità.

La maggiore espressione dell'AQP1, AQP4 e AQP5 nei vitelli che avevano assunto colostro (T2), comprovato anche dall'analisi densitometrica, suggerisce diverse ipotesi in merito all'effetto esercitato dal colostro durante le prime fasi di vita del vitello:

1) Possibile influenza nella modulazione delle AQPs grazie alle proprie caratteristiche nutrizionali e specifiche componenti chimiche.

2) Stimolazione dello sviluppo intestinale (proliferazione delle cellule epiteliali, sviluppo ottimale dei villi) con conseguente apertura dei poro-canale delle acquaporine o del loro stesso numero.

La prima ipotesi è sostenuta da osservazioni effettuate sul ratto da Laforenza, [132] dove l'autore dimostra che l'espressione dell'AQP6, che bilancia il movimento di acqua e di soluti attraverso l'epitelio dei villi, varia in funzione dell'alimentazione.

La seconda ipotesi è sostenuta da Blatter [133] e da una precedente ricerca di Baumrucker [134] che attribuisce al colostro un ruolo fondamentale nello



sviluppo dell'epitelio intestinale, più incisivo rispetto a quello osservato con il latte.

Altri autori attribuiscono invece ad alcuni enzimi come il CCK un ruolo cruciale nella regolazione dell'attività delle cellule intestinali [135] [136]. Secondo queste teorie, una somministrazione di colostro prolungata nel tempo potrebbe aumentare la capacità di assorbimento intestinale anche grazie all'elevata densità energetica e ai suoi fattori di crescita.

La maggiore espressione della proteina, osservata negli animali che avevano assunto colostro rispetto ai soggetti alimentati con solo latte e agli adulti, fornisce un'ulteriore conferma sul ruolo dell'AQP<sub>1</sub> non solo come trasportatore d'acqua ma anche come veicolo per altre molecole e ioni [137].

La possibile regolazione endocrina sull'espressione dell'AQP<sub>1</sub> richiede sicuramente ulteriori studi.

Nel corso della sperimentazione un dato interessante, confermato da studi effettuati sul pollo, [138] è stato il riscontro di isoforme dell'AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub> con peso molecolare superiore alla proteina naturale.

Questo dato potrebbe essere dovuto a processi post-transazionali di un diverso tipo di glicosilazione, la N-glicosilazione, costante con l'assenza del sito di consenso N-linked della glicosilazione [139].

Le varie isoforme dell'AQP<sub>1</sub> potrebbero avere un effetto sulla loro organizzazione intramembranaria (come l'allineamento, di cui non è stata ancora chiarita l'importanza fisiologica) o, più probabilmente, potrebbero essere collegati alla regolazione della permeabilità dell'acqua come suggerito per l'AQP<sub>4</sub> [140].

Altro dato interessante, emerso da questa sperimentazione anche se non sufficientemente approfondito, è stato il riscontro AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub> a livello dei neuroni enterici sia nel piccolo che nel grande intestino.

Le nostre osservazioni si trovano in pieno accordo con studi effettuati sul ratto [141] e sugli ovini [142] dove, pur essendo nota l'esatta localizzazione e la distribuzione cellulare della proteina nel sistema enterico, non è stato ancora ben chiarito il relativo ruolo fisiologico.

La presenza dell'AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub>, a livello di neuroni enterici, sembrerebbe comunque intervenire sull'omeostasi dei fluidi attraverso il trasporto di molecole a livello dell'epitelio intestinale e, di conseguenza, attraverso il controllo della pressione osmotica.

Riassumendo, possiamo sicuramente affermare che il nostro studio ha evidenziato, per la prima volta, la presenza dell'AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>4</sub> e AQP<sub>5</sub> lungo tutti i tratti intestinali del vitello bufalino permettendo di delineare la loro evoluzione durante lo sviluppo dell'animale (dalla nascita all'età adulta).

I dati dimostrano che tutte le acquaporine esaminate presentano una differente localizzazione, correlata al ruolo specifico nel trasporto dell'acqua e dei soluti, nella regolazione dell'omeostasi dei compartimenti liquidi e della pressione osmotica attraverso il sistema nervoso enterico.

La particolare espressione delle acquaporine verificata nell'apparato intestinale degli animali, ad una settimana dall'assunzione del colostro, potrebbe indicare, quindi, un'attivazione di tali complessi molecolari. Inoltre, la differente immunoreattività osservata in strutture diverse potrebbe essere riconducibile, come riportato da altri autori, a una specificità di attività (es. meccanismi di secrezione di ormoni, passaggio diretto di sostanze nel circolo ematico).

In conclusione, è possibile affermare che le acquaporine giocano un ruolo nei meccanismi di assorbimento di acqua e di numerosi soluti.

Resta ancora molto da indagare in merito al differente coinvolgimento di esse, allo specifico ruolo assunto e alla probabile presenza simultanea di altri meccanismi esistenti.

Ulteriori studi sono necessari per ampliare le conoscenze sullo specifico ruolo di questa proteina lungo il tratto intestinale e comprendere meglio i meccanismi di adattamento durante le fasi critiche dello sviluppo.

## Bibliografia

- [1] L. Zicarelli, «La carne di bufalo,» *Il sole 24 ore, Agrisole*, 2010.
- [2] V. Mudgal, «Comparatife efficiency for milk production of buffaloes and cattle in the tropics,» in *Proceedings of II World Buffalo Congress*, New Delhi, India, 1988.
- [3] S. Watanabe, S. Muramatsu e T. Oishi, «Swamp buffalo resource in South-East Asia with special reference to far east countries,» in *Proc.II World Buffalo Congress*, New Delhi, India, 1988.
- [4] M. Shalash e D. Tulloch, «Buffalos production systems in Africa and Australia,» in *Proceedings of II World Buffalo Congress.*, - New Delhi, India, 1988.
- [5] L. Zicarelli, «Evoluzione dell'allevamento bufalino in Italia.,» in *Atti I Congresso Nazionale sull'allevamento del bufalo*, Eboli (SA), 2001.
- [6] J. Odle, Z. R.T e D. and S.M, «Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance,» *Journal of animal science*, vol. 74, pp. 2509-2522, 1996.
- [7] P. Agre, S. Sasaki e M. Chrispeels, «Aquaporins: a family of water channel proteins,» *Am J Physiol Renal Physiol*, n. 265, p. 461, 1993.

- [8] B. M. Denker, B. L. Smith, F. P. Kuhajda e P. Agre, «Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules,» *J. Biol. Chem.* , vol. 263, p. 15634–15642, 1988.
- [9] G. M. Preston, T. P. Carroll, W. B. Guggino e P. Agre, «Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein,» *Science*, n. 256, p. 385–387, 1992.
- [10] G. Calamita, W. R. Bishai, G. M. Preston, W. B. Guggino e P. Agre, «Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*,» *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n. 44, p. 29063– 29066, 1995.
- [11] J. Jung, R. Bhat, G. Preston, W. Guggino, J. Baraban e P. Agre, «Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance,» *Proc. Natl. Acad. Sci.*, p. 13052–13056, 1994.
- [12] G. Wistow, M. Pisano e A. Chepelinsky, «Tandem sequence repeats in transmembrane channel proteins,» *Trends Biochem. Sci.* , p. 170–171, 1991.
- [13] G. Ren, V. S. Reddy, A. Cheng, P. Melnyk e A. K. Mitra, «Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice,» *Proc. Natl. Acad. Sci.* , vol. 65, p. 1398–1403, 2001.
- [14] K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel e Y. Fujiyoshi, «Structural determinants of water permeation through aquaporin-1,» *Nature*, vol. 64, n. 407, p. 599–605, 2000.

- [15] L. B. Shi, W. R. Skach e A. S. Verkman, «Functional independence of monomeric CHIP 28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimer,» *J. Biol. Chem*, vol. 63, p. 10417–10422, 1994.
- [16] M. L. Zeidel, S. V. Ambudkar, B. L. Smith e P. Agre, «Reconstitution of functional water channel in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein,» *Biochemistry*, p. 7436–7440, 1992.
- [17] H. Sui, B. G. Han, P. Wallian e B. K. Jap, «Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel,» *Nature*, n. 414, p. 872–878, 2001.
- [18] J. Morten, E. Tajkhorshid e K. Schulten, «Electrostatic tuning of permeation and selectivity in aquaporin water channels,» *Biophys. J.*, n. 85, p. 2884–2899, 2003.
- [19] N. Agmon, «The grotthuss mechanism,» *Chem. Phi. Let.*, n. 244, p. 456–462, 1995.
- [20] Morten, S. P. Jensen, E. Tajkhorshid e K. Schulten, «The mechanism of glycerol conduction in aquaglyceroporins,» *Structure*, vol. 9, pp. 1083–1093, 2001.
- [21] M. Zelenina, S. Zelenin, A. A. Bondar, H. Brismar e A. Aperia., «Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine,» *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 283, p. F309–F318, 2002.
- [22] S. Törnroth-Horsefield, Y. Wang, K. Hedfalk, U. Johanson, M. Karlsson, E. Tajkhorshid, R. Neutze e P. Kjellbom, «Structural mechanism of plant aquaporin gating,» *Nature*, vol. 439, pp. 688–694, 2005.

- [23] K. Fushimi, S. Uchida, Y. Hara, Y. Hirata, F. Marumo e S. Sasaki, «Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule,» *Nature*, n. 361, p. 549-552, 1993.
- [24] T. Matsuzaki, T. Suzuki, H. Koyama, S. Tanaka e a. K. Takata, «Water Channel Protein AQP<sub>3</sub> Is Present in Epithelia Exposed to the Environment of Possible Water Loss,» *J Histochem Cytochem.*, vol. 47(10), p. 1275-1286, 1999.
- [25] K. Ishibashi, S. Sasaki, K. Fushimi, S. Uchida, M. Kuwahara, H. Saito, T. Furukawa, K. Nakajima, Y. Yamaguchi e T. Gojobori, «Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells.,» in *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1994.
- [26] H. Hasegawa, T. Ma, W. Skach, M. Matthay e A. Verkman, «Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues,» *J. Biol. Chem.*, n. 269, p. 5497-5500, 1994.
- [27] A. Frigeri, M. Gropper, C. W. Turck e A. S. Verkman, «Immunolocalization of the mercurial insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes.,» *Proc. Natl. Acad. Sci.* , vol. 92, pp. 4328-4331, 1995.
- [28] A. Verkman, «Phenotype analysis of aquaporin transgenic mice,» *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 155, pp. 31-55, 2005.

- [29] M. Echevarria, E. E. Windhager, S. S. Tate e G. Frindt, «Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney,» *Proc Natl Acad Sci* , vol. 91, pp. 10997-11001, 1994.
- [30] Y. Koyama, T. Yamamoto, D. Kondo, H. Funaki, E. Yaoita, K. Kawasaki, N. Sato, K. Hatakeyama e I. Kihara, «Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver,» *J Biol Chem.*, vol. 272, p. 30329-30333, 1997.
- [31] H. Kuriyama, S. Kawamoto, N. Ishida, I. Ohno, M. S. K. Matsuzawa, Y. Matsubara e O. K., «Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability,» *Biochem Biophys Res Commun.* , vol. 241, 1997.
- [32] P. Agree, «The Aquaporin Water Channels,» *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 3, pp. 5-13, 2006.
- [33] D. Blood e O. Radostis, *Veterinary Medicine* 7th Ed, Oxford: ELBS, 1989.
- [34] B. Jenny , G. Cramling e T. Glaze , «Management factors associated with calf mortality in South Carolina dairy herds,» *J. Dairy Sci.*, n. 64, pp. 2284 - 2289, 1981.
- [35] J. Umoh , «Relative survival of calves in a university herd in Zaire, Nigeria,» *British Vet. J.*, n. 138, pp. 507 - 714, 1982.
- [36] E. Simensen e K. Norheim, «An epidemiological study of calf health and performance in Norwegian dairy herds,» *Acta Agric. Scand.*, n. 33, pp. 65 - 74, 1983.



- [37] C. Svensson, U. Emanuelson, K. Pettersson, T. M.J.M. e V. M.T., «Healt status of dairy calves in individual pens or in group pens with or without automatic milk feeder,» in *Proceedings of the 10 International Congress on Animal Hygiene, I*, Maastricht, 2000.
- [38] G. Gola, «Patologia del vitello lattante,» *Informatore zootecnico*, vol. 34 , pp. 57 - 61, 1992.
- [39] R. Parigi, A. Bini e S. D. Marco, *Zootecnia speciale dei bovini, Produzione della carne*, Bologna: Patron Editore, 1989, p. 253.
- [40] A. Khan e M. Khan, «Immunoglobulins in relation to neonatal calf mortality,» *Pakistan Vet.*, n. 11, pp. 153 - 162, 1991.
- [41] J. De Rycke, R. Bernard e J. Laporte, «Prevalence of various enteropathogenes in the feces of diarrheic and healthy calves,» *Annales de Recherches Veterinaires*, n. 17, pp. 159-168, 1986.
- [42] J. Collins, C. Riegel e J. Olson, «Shedding of enteris coronavirus in adult cattle,» *Am J Vet Res*, n. 48, pp. 361- 365, 1987.
- [43] C. Mebus, L. Newmann e E. Stair, «Scannino electron, light and immunofluorescent microscopi of intestines of gnotobiotic calf infected with calf diarrheal coronavirus,» *Am J Vet Res*, n. 34, pp. 1719-1726, 1975.
- [44] W. Moon, «Pathogenesis of enteric disease caused by Escherichia coli,» *Adv Vet Sci Comp Med*, n. 18, pp. 179-211, 1974.

- [45] M. Barrandeguy, E. Coranaglia, M. Gottashalk, N. Fijtman, M. Pasini, A. Yafal, J. Parrand e A. Shudel, «Rotavirus, enterotoxigenic *Escherichia coli* and other agents in the faeces of dairy calves with and without diarrhoea,» *Rev Lat America Microbiol*, n. 30, pp. 239-245, 1988.
- [46] T. Jones e R. Hunt, «Disease due to extraneous poisons,» *Veterinary Pathology*, 1983.
- [47] J. Dubey, R. Fayer e J. Rao, «Cryptosporidial oocysts in faeces of water buffalo and zebu cattle in India,» *J. Vet. Parasitol.*, n. 6, p. 55, 1992.
- [48] D. Snodgrass, H. Terzolo, D. Campbell, I. Sherwood, J. Menzies e B. Synge, «Aetiology of diarrhoea in young calves,» *Vet. Record.*, n. 119, pp. 31-34, 1986.
- [49] D. Balasini, *Zootecnica speciale*, Bologna: Edagricole, 1998.
- [50] G. Ballarini, *Malattie della bovina da latte ad alta produzione "BLAP"*, Edagricole, 1987.
- [51] G. Aguggini, V. Beghelli e L. Giulio, *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*, Torino: UTET, 1992.
- [52] B. Osburn, N. MacLachlan e T. Terrell, «Ontogeny of immune system,» *J Am Vet Med Assoc*, n. 181, pp. 1049-1052, 1984.

- [53] R. Frandson, *Anatomia, fisiologia e morfologia degli animal*, Milano: Edi-ermes, 1987.
- [54] P. Mornet e J. Espinasse, *Il vitello*, Roma: Marrapese Editore DEMI srl, 1979.
- [55] J. W. Blum, «Nutritional physiology of neonatal calves.,» *Anim Physiol Anim Nutr*, Vol. 1 di 290 (1-2), pp. 1-11, 2006.
- [56] N. Gregory, «Effect of enhancing curd formation during the first colostrum feed in absorption of gammaglutamyltransferase by newborn calves,» *Aust. Vet. J.*, n. 81 (9), pp. 549-252, 2003.
- [57] J. Matte, C. Girard e J. Seoane, «Absorption of colostral immunoglobulins G in the newborn dairy calf,» *Journal of Dairy Science*, n. 65 (9), pp. 235-254, 1982.
- [58] K. Rufibach, N. Stefanoni, V. Rey-Roethlisberger, P. Schneiter, M. Doherr, L. Tappy e J. Blum, «Protein Synthesis in Jejunum and Liver of Neonatal Calves Fed Vitamin A and Lactoferrin,» *J. Dairy Sci.*, n. 89, pp. 3075-3086, 2006.
- [59] J. Blom, «The relationship between serum immunoglobulin values and incidence of respiratory diseases and enteritis in calves,» *Nord Vet Med*, n. 34, pp. 276-284, 1982.
- [60] D. Church, *Livestock feeds and feeding*, 1991, p. 546.
- [61] C. Alais, «Scienza del latte,» vol. Tecniche nuove, Milano, 1984, p. 717.

- [62] G. Stott, D. Marx e B. Menefee, «Colostrum immunoglobulin transfer in calves I° period of absorption,» *J Dairy Sci.*, n. 62, pp. 1632-1638, 1979.
- [63] J. Tyler, B. Steevens e D. Hostetler, «Colostrum IgG concentration in Holstein and Guernsey cows,» *Am J Vet Res*, n. 60, pp. 1136- 1139, 1999.
- [64] L. Perino, T. Wittum e G. Ross, «Effects of various risk factors and plasma protein and serum immunoglobulin concentrations of calves postpartum hours 10 and 24,» *Am J Vet Res.*, n. 56, p. 1144, 1995.
- [65] T. Wittum e L. Perino, «Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves,» *American journal of veterinary research*, n. 56 (9), pp. 1149-1154, 1995.
- [66] D. Levieux, M. Yvon, M. Vallury, J. Pélissier e P. Mirand, «Colostrum protein digestion in newborn lambs,» *J Nutr. Mar*, n. 123 (3), pp. 586-589, 1993.
- [67] L. Zicarelli, A. Macri, A. Vittoria, P. Padula, S. Costantini, V. Rania e R. Giordano, «Intossicazione da rame in vitelli bufalini,» *Riv. Zoot. Vet.*, n. 9 (4), pp. 246-251, 1981.
- [68] V. Sciancalepore, Industrie agrarie. Olearia, enologica, lattiero-casearia, UTET, 1998.
- [69] G. Contarini, «Applicazione del metodo ufficiale della UE per la valutazione della genuinità del grasso di latte. Esperienze e suggerimenti,» *Riviste Italiana delle Sostanze Grasse*, 1997.

- [70] C. Alais, *Scienza del latte: principi di tecnologia del latte e derivati*, 2001.
- [71] G. Succi e I. Hoffman, *La vacca da latte.*, Città studi Milano, 1997, p. 886.
- [72] Ash R. W, «Abomasal secretion and emptying in suckled calves,» *J. Physiol.*, vol. 172, pp. 425-438, 1964.
- [73] A. Gobetto e S. Pellegrini, *Anatomia e fisiologia degli animali zootecnici.*, 1979.
- [74] G. Succi, *Zootecnica speciale*, Clesav, 1990.
- [75] P. Kruse, «The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals.,» *Ann Rech Vet.*, n. 14, pp. 349-353, 1983.
- [76] R. Xu, «Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum milk intake: a review,» *Reprod Fertil Dev.*, n. 8, p. 35-48, 1996.
- [77] E. Zhang, «Intestinal water and electrolyte transport,» *Gastrointestinal, Hepatobiliary, and Nutritional Physiology*, pp. 91-118, 1996.
- [78] K. Spring, «Routes and mechanism of fluid transport by epithelia,» *Annual Review of Physiology*, n. 60, pp. 105-119, 1998.

- [79] J. Fordtran, F. Rector, M. Ewton, N. Soter e J. Kinney, «Permeability characteristics of the human small intestine,» *Journal of Clinical Investigation*, n. 44, pp. 1935-1944, 1965.
- [80] W. Hindle e C. Code, «Some differences between duodenal and ileal absorption,» *American Journal of Physiology*, n. 203, pp. 215-220, 1969.
- [81] H. Worman e M. Field, «Osmotic water permeability of small intestinal brush border membranes,» *Journal of Membrane Biology*, n. 87, pp. 233-239, 1985.
- [82] C. Edmonds, «Water and ionic transfer pathways of mammalian large intestine,» *Clinical Science*, n. 61, pp. 257-263, 1981.
- [83] M. Welsh, M. Fromm e R. Frizzell, «Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion,» *Science*, n. 218, pp. 1219-1221, 1982.
- [84] R. Naftalin e K. Pedley, «Video enhanced imaging of the fluorescent Na<sup>+</sup> probe SBFI indicates the colonic crypts absorb fluid by generating a hypertonic interstitial fluid,» *FEBS Letters*, n. 260, pp. 187-194, 1990.
- [85] T. Ma e A. Verkman, «Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology,» *J. Physiol*, n. 517, pp. 317-326, 1999.
- [86] M. Field, «Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea,» *J. Clin. Invest.*, n. 111(7), pp. 931-943, 2003.

- [87] B. Kaissling e W. Kriz, «Structure-function correlation in transporting epithelia.,» *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, pp. 307-315, 1985.
- [88] D. Granger, M. Perry e P. kviety, «The microcirculation and fluid transport in digestive organs,» *Fed. Proc.*, n. 42 (6), pp. 1667-1672, 1983.
- [89] D. Powell, «Barrier function of epithelia,» *Am. J. Physiol.*, n. 241 (4), p. G275-G288, 1981.
- [90] A. Masyuk, R. Marinelli e N. LaRusso, «Water transport by epithelia of the digestive tract,» *Gastroenterology*, n. 122 (2), p. 545-562, 2002.
- [91] E. Chang e M. Rao, «Intestinal water and electrolyte transport,» *Physiology of the Gastrointestinal Tract, third ed. Raven*, p. 2027-2081, 1994.
- [92] S. Schultz, «Epithelial water absorption: osmosis or cotransport?,» *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n. 98 (7), p. 3628-3630, 2001.
- [93] F. Charron, M. Blanchard e J. Lapointe, «Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na<sup>+</sup>/glucose cotransport.,» *Biophys. J.*, n. 90 (10), p. 3546-3554, 2006.
- [94] S. Nielsen, B. Smith, E. Christensen e P. Agre, «Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia,» *Proc Natl Acad Sci*, vol. 24, n. 90, p. 7275-7279, 1993.

- [95] J. S. Ma T, K. Wang, Y. Song, L. J. Yang B, J. Bastidas e A. Verkman, «Defective dietary fat processing in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels,» *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 27, n. 280, p. C126–C134, 2001.
- [96] P. Tso, V. Pitts e D. Granger, «Role of lymph flow in intestinal chylomicron transport,» *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 28, p. G21–G28, 1985.
- [97] S. Roberts, M. Yano, Y. Ueno, L. Pham, G. Alpini, P. Agre e N. LaRusso, «Cholangiocytes express the aquaporin CHIP and transport water via a channel-mediated mechanism,» *Proc Natl Acad Sci*, vol. 29, n. 91, p. 13009–13013, 1994.
- [98] R. Marinelli, P. Tietz, L. Pham, L. Rueckert, P. Agre e N. LaRusso, «Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes,» *Am J Physiol.*, vol. 30, n. 276, p. G280–G286, 1999.
- [99] S. Furuya, S. Naruse, S. Ko, H. Ishiguro, T. Yoshikawa e T. Hayakawa, «Distribution of aquaporin 1 in the rat pancreatic duct system examined with light- and electron-microscopic immunohistochemistry,» *Cell Tissue Res.*, vol. 31, n. 308, p. 75–86, 2002.
- [100] T. Ma, M. Hara, R. Sougrat, J.-M. Verbavatz e A. Verkman, «Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3,» *J Biol Chem*, vol. 36, n. 277, p. 17147–17153, 2002.
- [101] A. Frigeri, M. Gropper, F. Umenishi, M. Kawashima, D. Brown e A. Verkman, «Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues,» *J Cell Sci.*, vol. 41, n. 108, p. 2993–3002, 1995.



- [102] K. Wang, A. Komar, T. Ma, F. Filiz, J. McLeroy, K. Hoda, A. Verkman e B. A, «Gastric acid secretion in aquaporin-4 knockout mice,» *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* , vol. 42, n. 279, p. G448–G453, 2000.
- [103] S. Raina, G. Preston, W. Guggiono e P. Agre, «Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from saliva, lacrimal, and respiratory tissues,» *J Biol Chem*, n. 270, p. 1908–1912, 1995.
- [104] T. Matsuzaki, Y. Tajika e S. Takeshi, «Immunolocalization of the water channel, aquaporin-5 (AQP5), in the rat digestive system,» *Arch Histol Cytol.*, vol. 66, n. 4, pp. 307–315, 2003.
- [105] T. Matsuzaki, T. Suzuki , H. Koyama, S. Tanaka e K. Takata , «Aquaporin-5 (AQP5), a water channel protein, in the rat salivary and lacrimal glands: immunolocalization and effect of secretory stimulation,» *Cell Tissue Res*, n. 295, p. 513–521, 1999.
- [106] T. Ma, Y. Song , A. Gillespie , E. Carlson, C. Epstein e A. Verkman, «Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels,» *J Biol Chem*, n. 274, p. 20071–20074, 1999.
- [107] C. Krane , J. Melvin, . H.-V. Nguyen, L. Richardson , J. Towne, T. Doetschman e A. Menon, «Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water perpermeability and altered cell volume regulation,» *J Biol Chem*, n. 276, p. 23413–23420, 2001.

- [108] Y. Ishikawa, T. Eguchi, M. Skowronski e H. Ishida, «Acetylcholine acts on M<sub>3</sub> muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation in rat parotid glands,» *Biochem Biophys Res Commun*, n. 245, p. 835–840, 1998.
- [109] P. Deen, M. Verdijk, N. Knoers , B. Wieringa, L. Monnens, C. van Os e B. van Oost, «Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine,» *Science*, n. 264, p. 92–95, 1994.
- [110] S. Steinfeld, E. Cogan, L. King, P. Agre, R. Kissl e C. Delporte, «Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjögren's syndrome patients,» *Lab Invest*, n. 81, p. 143–148, 2001.
- [111] K. Tsubota, S. Hirai, L. King, P. Agre e N. Ishida, «Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome,» *Lancet*, n. 357, p. 688–689, 2001.
- [112] K. Ishibashi, M. Kuwahara, Y. Kageyama, A. Tohsaka, F. Marumo e S. Sasaki, «Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis,» *Biochem Biophys Res Commun*, n. 237, p. 714–718, 1997.
- [113] M.-L. Elkjær, L. Nejsum, V. Gresz, T.-H. Kwon, U. Jensen, J. Frøkiær e S. Nielsen, «Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways,» *Am J Physiol Renal Physiol*, n. 281, p. F1047–F1057, 2001.

- [114] R. Wellner, A. Hoque, C. Goldsmith e B. Baum, «Evidence that aquaporin-8 is located in the basolateral membrane of rat submandibular gland acinar cells,» *Pflügers Arch Eur J Physiol*, n. 441, p. 49–56, 2000.
- [115] G. Calamita, A. Mazzone, A. Bizzoca, A. Cavalier, G. Cassano, D. Thomas e M. Svelto, «Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract,» *Eur J Cell Biol*, n. 80, p. 711–719, 2001.
- [116] T. Tani, Y. Koyama, K. Nihei, S. Hatakeyama, K. Ohshiro, Y. Yoshida, E. Yaoita, Y. Sakai, K. Hatakeyama e T. Yamamoto, «Immunolocalization of aquaporin-8 in rat digestive organs and testis,» *Arch Histol Cytol*, n. 64, p. 159–168, 2001.
- [117] K. Ishibashi, M. Kuwahara, Y. Gu, Y. Tanaka, F. Marumo e S. Sasaki, «Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol,» *Biochem Biophys Res Commun*, n. 244, pp. 268–274, 1998.
- [118] H. Tsukaguchi, C. Shayakul, U. Berger, B. Mackenzie, S. Devidas, W. Guggino, A. van Hoek e M. Hediger, «Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel,» *J Biol Chem*, n. 273, p. 24737–24743, 1998.
- [119] K. Kishida, I. Shimomura, H. Kondo, H. Kuriyama, Y. Makino, H. Nishizawa, N. Maeda, M. Matsuda, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Kurachi, T. Funahashi e Y. Matsuzawa, «Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel,» *J Biol Chem*, n. 276, p. 36251–36260, 2001.

- [120] K. Kishida, H. Kuriyama, T. Funahashi, I. Shimomura, S. Kihara, N. Ouchi, M. Nishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, M. Takahashi, K. Hotta, T. Nakamura, S. Yamashita, Y. Tochino e Y. Matsuzawa, «Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes,» *J Biol Chem*, n. 275, p. 20896–20902, 2000.
- [121] J. Carbrey, D. Gorelick-Feldman, D. Kozono, J. Praetorius, S. Nielsen e P. Agre, «Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver,» *Proc Natl Acad Sci USA*, n. 100, p. 2945–2950, 2003.
- [122] S. Okada, T. Misaka, I. Matsumoto, H. Watanabe e K. Abe, «Aquaporin-9 is expressed in a mucus-secreting goblet cell subset in the small intestine,» vol. FEBS Lett, n. 540, p. 157–162, 2003.
- [123] K. Ishibashi, T. Morinaga, M. Kuwahara, S. Sasaki e M. Imai, «Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin,» *Biochim Biophys Acta*, vol. 75, n. 1576, pp. 335–340, 2002.
- [124] T. Morinaga, M. Nakakoshi, A. Hirao, M. Imai e K. Ishibashi, «Mouse aquaporin 10 gene (AQP10) is a pseudogene,» *Biochem Biophys Res Commun*, n. 294, pp. 630–634, 2002.
- [125] H. Li, J. Kamiie, Y. Morishita, Y. Yoshida, E. Yaoita, K. Ishibashi e Y. T., «Expression and localization of two isoforms of AQP10 in human small intestine,» *Biol Cell.*, vol. 97, n. 11, pp. 823–829, 2005.
- [126] U. La forenza, «Water channel proteins in the gastrointestinal tract,» *Molecular Aspects of Medicine*, 2012.

- [127] S. Nielsen, B. Smith, E. Christensen, M. Knepper e P. Agre, «CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron,» *J Cell Biol.*, vol. 22, n. 120, p. 371-383, 1993.
- [128] T. Koyama, T. Yamamoto, T. Ti, K. Nihe, D. Kondo, H. Funaki, E. Yaoita, K. Kawasaki, N. Sato, K. Hatakeyama e I. Kihara, «Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract,» 1999.
- [129] N. R.J. e K. Pedley, «Regional crypt function in rat large intestine in relation to fluid absorption and growth of the pericryptal sheath,» *The Journal of Physiology*, n. 514, pp. 211-217, 1999.
- [130] R. Naftalin, «The dehydrating function of the descending colon in relationship to crypt function,» *Physiological Research*, n. 43, pp. 65-73, 1994.
- [131] M. C., R. Rousseau, J. Soria, O. Hoque, J. J. S. Lee, B. Trink, D. Sidransky e L. Mao, «Aquaporin expression in human lymphocytes and dendritic cells,» *American Journal of Hematology*, n. 75, pp. 128-133, 2004.
- [132] U. Laforenza, G. Gastaldi, R. Polimeni, S. Tritto, M. Tosco, U. Ventura, M. Scaffino e M. Yasui, «Aquaporin-6 is expressed along the rat gastrointestinal tract and upregulated by feeding in the small intestine,» *BMC Physiology*, pp. 9-18, 2009.

- [133] U. Blatter, H. H.M., C. Morel, C. Philipona, V. Rauprich Romè, I. Le Huerou-Luron, P. Guilloteau e J. Blum, «Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves,» *Journal of Nutrition*, vol. 4, n. 131, pp. 11256-11263, 2001.
- [134] C. Baumrucker, D. Hadsell e J. Blum, «Effects of dietary insulin-like growth factor I on growth and insulin-like growth factor receptors in neonatal calf intestine,» *Journal of Animal Science*, vol. 72, pp. 428-433, 1994.
- [135] P. Guilloteau, R. Zabielsk e B. J.W., «Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations,» *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 3, n. 60, pp. 37-46, 2009.
- [136] M. Biernat, Z. P.C., P. Sysa, B. Sosak-Swidarska, I. Le Huërou-Luron e P. Guilloteau, «Small intestinal and pancreas microstructures are modified by an intraduodenal CCK-A receptor antagonist administration in neonatal calves,» *Regulatory Peptides*, n. 8, 1999.
- [137] A. Verkman, «More than water channel: unexpected cellular roles of aquaporins,» *Journal of Cell Science*, n. 118, pp. 3222-3225, 2007.
- [138] G. Casotti, T. Waldron, G. Misquith, D. Powers e L. Slusher, «Expression and localization of an aquaporin-1 homologue in the avian kidney and lower intestinal tract,» *Comparative Biochemistry and Physiology*, n. 147, pp. 355-362, 2007.

- [139] U. Laforenza, G. Gastald, M. Grazioli, E. Cova, S. Tritto, A. Faelli, G. Calamita e U. Ventura, «Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract,» *Biological Chemistry*, n. 97, pp. 605-613, 2005.
- [140] K. Yoshimura, K. Sugiura e Y. Ohomori, «Immunolocalization of aquaporin-4 in the brain, kidney, skeletal muscle, and gastrointestinal tract of chicken,» n. 344, pp. 51-61, 2011.
- [141] M. Nagahama, N. Ma, R. Semba e S. Naruse, «Aquaporin 1 immunoreactive enteric neurons in the rat ileum,» *Neuroscience Letters*, n. 395, pp. 206-210., 2006.
- [142] M. Arciszewski, M. Stefaniak, A. Zacharko-Siembida e J. Calka, «Aquaporin 1 water channel is expressed on submucosal but not myenteric neurons from the ovine duodenum,» *Annals of Anatomy*, n. 193, pp. 81-85, 2011.

## Indice delle figure

Figura 1: Famiglie di acquaporine tratto da: <i>Nature Reviews Molecular Cell Biology</i> 5, 687-698 (September 2004) .....	6
Figura 2: Architettura di base delle acquaporine. Tratto da <i>Kruse et al. Genome Biology</i> 2006 .....	7
Figura 3: Rappresentazione schematica del canale che evidenzia i meccanismi principali su cui si basa la selettività di trasporto tratto da: <i>Lehninger Principles of Biochemistry</i> 2008 W. H. Freeman Dave Nelson and Mike Cox. ....	10
Figura 4: Tratto da: <i>Molecular Aspects of Medicine</i> Laforenza U (2012) 33 642-650 .....	50
Figura 5: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 1 nel digiuno di bufalo al To (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) C cripte; sb sottomucosa; ganglio sottomucoso; barra 25 micron .....	62
Figura 6: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 1 nel colon di bufalo al To (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) C cripte; sb sottomucosa; barra 25 micron .....	63
Figura 7: Western blot - AQP1 nel piccolo e grosso intestino .....	64
Figura 8: Grafico dell'analisi densitometrica dell'AQP1 .....	66
Figura 9: RT-PCR per AQP1 nei gruppi (TO, T1, T2, T3) .....	67
Figura 10: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 4 nel duodeno di bufalo al To (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) C cripte; sb sottomucosa; barra 25 micron .....	69
Figura 11: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 4 nel colon di bufalo al To (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) .....	70
Figura 12: Western blot - AQP4 nel piccolo e grosso intestino .....	72
Figura 13: Grafico dell'analisi densitometrica dell' AQP4 nei vari tratti intestinali .....	73
Figura 14: RT-PCR per AQP4 nei gruppi (TO, T1, T2, T3) .....	74
Figura 15: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 5 nel duodeno di bufalo al To (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) C cripte; sb sottomucosa; barra 25 micron .....	76
Figura 16: Fig. 6 Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 5 nel colon di bufalo al To (a), T1 (b), T2 (c) e T3 (d) sb sottomucosa; barra 25 micron .....	77
Figura 17: Western blot - AQP5 nel piccolo e grosso intestino .....	79
Figura 18: Grafico dell'analisi densitometrica dell' AQP5 nei vari tratti intestinali .....	80
Figura 19: RT-PCR per AQP5 nei gruppi (TO, T1, T2, T3) .....	81



## Indice delle tabelle

Tabella 1: Classificazione delle Acquaporine.....	6
Tabella 2: <i>Valori delle principali componenti del latte bufalino e bovino (Proto, 1995 – modificato 2002).</i> ..	24
Tabella 3: <i>Schema generale della successione microbica nel tratto gastroenterico dei mammiferi (Villa e Giardini, 2007)</i> .....	26
Tabella 4: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 1.....	62
Tabella 5: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 1.....	63
Tabella 6: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 4 .....	69
Tabella 7: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 4 .....	70
Tabella 8: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 5 .....	76
Tabella 9: Distribuzione dell'immunoreattività all'acquaporina 5 .....	77